



**Universidade de
Aveiro
2010**

Departamento de Biologia

**André Fernando Variabilidade em *Escherichia coli* de águas poluídas
Anastácio dos Santos de Vila Franca de Xira**



**Universidade de
Aveiro
2010**

Departamento de Biologia

André Fernando
Anastácio dos Santos

**Variabilidade em *Escherichia coli* de águas poluídas
de Vila Franca de Xira**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada no ramo da Microbiologia Clínica e Ambiental, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor António Correia, Professor Catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e co-orientada pela Doutora Anabela de Oliveira Pereira do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

Prof. Doutor António José Arsénia Nogueira

professor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria José Félix Saavedra

professora associada com agregação no Departamento de Ciências Veterinárias da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Prof. Doutor António Carlos Matias Correia

professor Catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Anabela de Oliveira Pereira

investigadora de Pós-Doutoramento no CESAM - Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao Professor Doutor António Correia, orientação durante o desenvolvimento do trabalho.

À Doutora Anabela pela ajuda e compreensão durante a realização do trabalho prático e teórico.

À Eng. Vitória por toda a atenção e dedicação que mostrou durante a realização deste projecto.

À Helena pela atenção e ao constante interesse no projecto, e ao Jaime pela grande disposição e amizade que se fez denotar durante as saídas de campo.

A todas as pessoas do Laboratório do SMAS de Vila Franca de Xira que tornaram este projecto possível, como a Eng. João e a técnica Dulce, pelo apoio nas análises químicas no laboratório, a técnica Rute e à D. Celeste, pelo trabalho desempenhado muitas vezes no tratamento do material.

A todo o pessoal do Laboratório do Professor Doutor António Correia, pela paciência, pelo apoio ao final do dia, pela ajuda nos momentos de maior pressão e sobretudo pelo companheirismo que demonstraram ter para comigo.

A todos muito obrigado por toda a dedicação, ajuda, companheirismo, disposição e consideração que tiveram para comigo durante a realização deste trabalho.

palavras-chave

Poluição microbiana – Águas residuais – Saúde pública –
Tipagem genética – Source Tracking

resumo

Actualmente existe uma grande preocupação a nível mundial com o estado de poluição da água. O uso indevido deste bem essencial tem agravado a sua qualidade. Um dos tipos de poluição aquática mais preocupantes é a poluição fecal, sendo esta estudada com base em indicadores bacteriológicos que permitem a identificação do estado de poluição da água. Os indicadores bacteriológicos de poluição fecal, idealmente, correlacionam-se com a presença/ausência de bactérias patogénicas, apresentando perfis de sobrevivência semelhantes. Os indicadores normalmente utilizados são as bactérias Coliformes, entre as quais *E. coli*, e o grupo dos Enterococos. Estas bactérias são entéricas e algumas delas patogénicas, podendo provocar graves doenças nos seres vivos.

Este trabalho propôs-se a (1) analisar a qualidade microbiológica de sete linhas de água existentes no concelho de Vila Franca de Xira, que por sua vez afluem ao Rio Tejo e (2) detectar fontes de contaminação fecal, utilizando uma metodologia de *Microbial source Tracking*, REP-PCR. Com base nos resultados obtidos em (1) identificaram-se duas linhas de água com níveis de poluição muito preocupantes, podendo as restantes cinco considerarem-se como preocupantes. Em (2) verificou-se que existe uma elevada variabilidade de *E. coli* no concelho de Vila Franca de Xira, no entanto não foi possível detectar as fontes de poluição orgânica.

keywords

Microbial pollution – Wastewater – Public health – Genetic typing
– Source Tracking

abstract

Currently there is a worldwide concern about the pollution conditions of water. The misuse of this resource has decreased its quality. Fecal pollution is one of the most worrying kinds of water pollution. This study is based on bacteriological indicators that allow the evaluation of levels of fecal pollution in waters. Bacterial indicators of fecal pollution must be, ideally, correlated with the presence/absence of pathogenic bacteria, and their survival profiles similar. The indicators commonly used are the Coliform bacteria, including *E. coli*, and Enterococci. These are bacterial enteric pathogens and many of them can cause serious diseases in living beings. The aim of this study was (1) the microbiological quality analysis of seven water lines in the municipality of Vila Franca de Xira, that flood in to the Tejo River and (2) the analysis of the source of fecal pollution with the use the *Microbial Source Tracking* techniques, REP-PCR. As a result of this study, (1) two water lines were identified as of much concern, when compared to the remaining five, and (2) the *Microbial Source tracking* technique showed a great variability of *E. coli* in the municipality of Vila France de Xira, but could not found the sources of fecal pollution in the analyzed waters.

Lista de figuras

Figura 1. Localização da Cidade de Vila Franca de Xira, assinalada com um A. (<i>In</i> : http://maps.google.pt/).....	2
Figura 2. Figura detalhada da divisão do Concelho de V. F. de Xira (<i>In</i> : Soares & Coutinho, 2004)	2
Figura 3. Representação esquemática de algumas metodologias utilizadas em MST (Santo Domingo <i>et al.</i> , 2007).....	9
Figura 5. 1-Localização da linha de água B (<i>in</i> : http://maps.google.pt/) e 2-fotografia da linha de água B.....	12
Figura 4. 1-Localização da linha de água A (<i>in</i> : http://maps.google.pt/) e 2-fotografia da linha de água A.....	12
Figura 7. 1-Localização da linha de água D (<i>in</i> : http://maps.google.pt/) e 2-fotografia da linha de água D.....	13
Figura 6. 1-Localização da linha de água C (<i>in</i> : http://maps.google.pt/) e 2-fotografia da linha de água C.....	13
Figura 8. 1-Localização da linha de água E _a (<i>in</i> : http://maps.google.pt/) e 2-fotografia da linha de água E _a	13
Figura 9. 1-Localização da linha de água E _b (<i>in</i> : http://maps.google.pt/) e 2-fotografia da linha de água E _b	14
Figura 10. 1-Localização da linha de água F _{a/b} (<i>in</i> : http://maps.google.pt/) e 2-fotografia da linha de água F _{a/b}	14
Figura 11. 1-Localização da linha de água G _{a/b} (<i>in</i> : http://maps.google.pt/) e 2-fotografia da linha de água G _{a/b}	15
Figura 12. Número de UFC's logaritmizados em base 10 de Coliformes totais, Enterococcus e <i>E. coli</i> , para as linhas de água E _a – Rib ^a da Alfarrobeira e E _b – Rib ^a da Verdelha. Valores médios representados pelas linhas a tracejado.	25
Figura 13. Número de UFC's logaritmizados em base 10 de Coliformes totais, Enterococcus e <i>E. coli</i> , para as linhas de água F _{a/b} – Riacho do Estaleiro. Valores médios representados pelas linhas a tracejado.	27
Figura 14. Número médio de UFC's de Coliformes totais logaritmizados em base 10 para todas as linhas de água monitorizadas. Valores máximo e mínimo representados pelas barras a preto.....	30

Figura 15. Imagem de perfis de bandas resultados da REP-PCR analisados durante o trabalho.

..... 32

Figura 16. Dendrograma de similaridade dos controlos positivos P2 e P6 presentes nos 14 géis, analisado pelo coeficiente de Pearson com uma tolerância de 1% e optimização de 1,60%. O traço a vermelho corresponde a um corte a 72% de similaridade. 33

Figura 17. Dendrograma de similaridade dos isolados de D e A, analisado pelo método de correlação de Pearson com uma tolerância de 1% e optimização de 1,60%. A linha a vermelho é a zona de corte a 72%. 35

Figura 18. Dendrograma de similaridade dos isolados de Ea e Eb, analisado pelo método de correlação de Pearson com uma tolerância de 1% e optimização de 1,60%. A linha a vermelho é a zona de corte a 72%. 37

Figura 19. Dendrograma de similaridade dos isolados de Fa e Fb, analisado pelo método de correlação de Pearson com uma tolerância de 1% e optimização de 1,60%. A linha a vermelho é a zona de corte a 72%. 39

Figura 20. Dendrograma de similaridade dos isolados de Ga e Gb, analisado pelo método de correlação de Pearson com uma tolerância de 1% e optimização de 1,60%. A linha a vermelho é a zona de corte a 72%. 40

Figura 21. Dendrograma que diferencia as zonas de amostragem mediante as similaridades existentes entra as comunidades intra-específicas de *E. coli*. A linha de corte a 20% de similaridade. Análise segundo o método de Jaccard. 41

Lista de tabelas

Tabela 1. Exemplos de três marcadores específicos para contaminação fecal humana (Harwood <i>et al.</i> , 2009).	7
Tabela 2. Comparação de métodos utilizados para MST (<i>adaptado de</i> : Meyas <i>et al.</i> , 2004; Seurinck <i>et al.</i> , 2005).....	8
Tabela 3. Classificação relativa à qualidade da água estudada tendo em conta uma escala de valores de UFC'S/100ml para os diferentes parâmetros.	20
Tabela 4. Valores da contagem dos diferentes indicadores em 6 colheitas da linha de água A - Vala do Carregado. x - incontável	21
Tabela 5. Parâmetros químicos determinados para a linha de água A – Vala do Carregado.	21
Tabela 6. Valores da contagem dos diferentes indicadores em 6 colheitas da linha de água B – Vala da Central Eléctrica.	22
Tabela 7. Parâmetros químicos determinados para a linha de água B – Vala da Central Eléctrica.	22
Tabela 8. Valores da contagem dos diferentes indicadores em 6 colheitas da linha de água C – Descargas da Fábrica de Tomate.	23
Tabela 9. Parâmetros químicos determinados para a linha de água C – Descargas da Fábrica de Tomate.	23
Tabela 10. Valores da contagem dos diferentes indicadores em 6 colheitas da linha de água D – Rio Grande da Pipa.....	24
Tabela 11. Parâmetros químicos determinados para a linha de água D – Rio Grande da Pipa..	24
Tabela 12. Valores da contagem dos diferentes indicadores em 6 colheitas das linhas de água E _a – Rib ^a da Alfaroqueira E _b – Rib ^a da Verdelha. x - incontável. S - seca.	25
Tabela 13. Parâmetros químicos determinados para a linha de água E _b – Rib ^a da Verdelha.....	26
Tabela 14. Valores da contagem dos diferentes indicadores das linhas de água F _a – Riacho do Estaleiro e F _b – Riacho do Estaleiro. x - incontável.....	27
Tabela 15. Parâmetros químicos determinados para a linha de água F _b – Riacho do Estaleiro.	28
Tabela 16. Valores da contagem dos diferentes indicadores em 5 colheitas da linha de água G _{a/b} – Vala mar de Cães. x - incontável.....	28
Tabela 17. Parâmetros químicos determinados para a linha de água G _{a/b} – Vala mar de Cães.	29
Tabela 18. Tabela de cálculo da ANOVA, apresentando o SQ, gl, MQ, F _{calc} , valor de P e F _{0,05;9;41} crítico. Sendo H0: $\mu_1=\mu_2=\mu_3=...$ e H1: existe alguma diferença entre essas médias.....	31

Tabela 19. Tabela de cálculo do teste de Tukey, apresentando o EP, o q_{calc} e $q_{0,05;10;41}$. Sendo que, se os valores de q_{calc} para cada par de médias for maior que $q_{0,05;10;41}$, então os grupos diferem entre si.....	31
Tabela 20. Tabela representativa do número de isolados obtidos por zona de amostragem. ..	32
Tabela 21. Tabela da análise dos dendrogramas individuais de cada zona de amostragem, em relação ao número de genótipos encontrados de entre os isolados de cada local.....	34

Índice

Enquadramento do projecto.....	1
Introdução.....	2
• Localização	2
• Indicadores microbiológicos	3
• Metodologias	5
Monitorização da qualidade microbiológica da água	5
Identificação das fontes de poluição fecal.....	6
• Objectivo	11
Material e Métodos.....	12
• Locais de amostragem.....	12
• Amostragem	15
• Metodologias	15
Monitorização das linhas de água.....	15
Tipagem dos isolados por REP-PCR.....	18
Resultados e Discussão	20
Monitorização das linhas de água em estudo.....	20
(A) – Vala do Carregado	21
(B) – Vala da Central Eléctrica	22
(C) – Descargas da Fábrica de Tomate	23
(D) – Rio Grande da Pipa	24
(E _a) – Rib ^a da Alfarrobeira e (E _b) – Rib ^a da Verdelha	25
(F _{a/b}) – Riacho do Estaleiro	27
(G _{a/b}) – Vala Mar de Cães	28
Discussão final	30
Tipagem molecular.....	32
Análise individual dos dendrogramas	34
Análise do “input” de contaminação nas zonas de amostragem D-A-E _a -E _b -F _a -F _b -G _a -G _b	35

Análise final	41
Conclusões	43
Considerações finais.....	45
Referências Bibliográficas	46
Anexos.....	50
• I – Esquema do método com o meio TTC Tergitol	50
• II – Esquema do método com o meio Chromocult® Coliform Agar	51
• III – Equações utilizadas	52
• IV – Dendrogramas das Zonas de amostragem.....	54
(A) – Vala do Carregado	54
(B) – Vala da Central Eléctrica	55
(C) – Descargas da Fábrica de Tomate	56
(D) – Rio Grande da Pipa	56
(E _a) – Rib ^a da Alfarrobeira	57
(E _b) – Rib ^a da Verdelha	58
(F _a) – Riacho do Estaleiro.....	58
(F _b) – Riacho do Estaleiro	59
(G _a) – Vala mar de Cães.....	60
(G _b) – Vala mar de Cães.....	60
• V – Tabela da diversidade de genótipos e a sua distribuição	61
• VI – Dendrograma Final.....	62

Enquadramento do projecto

O Rio Tejo é um dos rios mais importantes de Portugal, não só pela sua dimensão e influência na economia local mas também por ser classificado como *Zona de Protecção Especial* (ZPE) (ICN, 1994).

A intensificação de algumas actividades como a agricultura, a industrialização e o constante aumento da população em redor do Rio, têm contribuído para o aumento da poluição da água que neste circula (Baião *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 2002). Este problema coloca a saúde pública e animal em risco devido à presença de bactérias ou vírus patogénicos (Lu *et al.*, 2005). Nos últimos anos, o Rio Tejo tem sido considerado bastante prejudicial para a saúde dos animais e das pessoas que dele dependem, estando qualificado como muito poluído, de acordo com os estudos efectuados pelo *Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos* (SNIRH) (SNIRH, 2010). A requalificação do Rio Tejo, recuperando a qualidade da água, restabelecendo o funcionamento dos ecossistemas e a recolonização por espécies que foram desaparecendo ao longo dos anos, permitirá otimizar as múltiplas condições oferecidas por este sistema aquático.

A candidatura da Cultura Avieira a património nacional levantou novamente a discussão sobre a poluição do rio e a urgência em tomar medidas no sentido da sua recuperação.

Os Avieiros constituem ainda hoje uma comunidade viva de pescadores, originários de Vieira de Leiria, de onde se deslocaram em meados do século XIX (Nunes, 1993). Muitos deles continuam a depender da actividade piscatória que praticam no Tejo e nos seus afluentes (Marques, 2010). Atendendo às circunstâncias da sua vida comunitária e à forma como se estabeleceram ao longo do rio Tejo, assim se afirmaram com uma cultura com características muito peculiares, que hoje são apresentadas num projecto de candidatura a património nacional. Este projecto de investimento, que é também de investigação científica sobre os ecossistemas do Tejo, tem como líder o Instituto Politécnico de Santarém e 41 instituições parceiras, entre empresas privadas, autarquias, associações para o desenvolvimento, paróquias, institutos de ensino superior e universidades, dentre as quais a Universidade de Aveiro (Serrano, 2010).

Por outro lado, a gastronomia regional, com base no peixe do Rio Tejo, que cada vez tem maior procura na região e no País, está em risco de não se afirmar com o valor que intrinsecamente revela, dado que a poluição, o assoreamento e as barragens, ameaçam a sustentabilidade da pesca e a própria visibilidade das espécies do Tejo (Costa *et al.*, 1990). Deste modo, é necessário efectuar os estudos e as correspondentes acções que permitam reverter as consequências deste cenário.

Neste contexto, o trabalho aqui apresentado tem por objectivo testar metodologias de detecção e discriminação de fontes de poluição microbiana em cursos de água da região Avieira. Uma intervenção mais efectiva terá de estar associada a procedimentos experimentais de rápida execução recorrendo a técnicas adequadas ao sistema em estudo.

Introdução

• **Localização**

O concelho de Vila Franca de Xira é constituído por 11 freguesias dispersas por 317,68 Km², com um total de 122 908 habitantes e uma densidade populacional de 387 Hab/Km² (I.N.E., 2007).

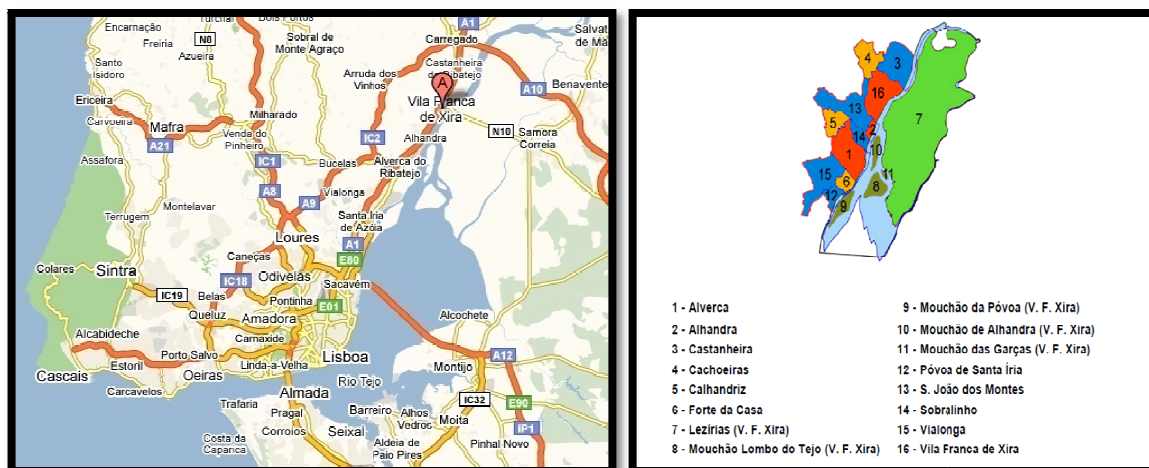


Fig. 1. Localização do Concelho de Vila Franca de Xira, ps.google.pt/

Figura 2. Figura detalhada da divisão do Concelho de V. F. de Xira (In: Soares & Coutinho, 2004)

Situa-se no início do estuário do Tejo (zona de contacto com o Oceano Atlântico, como se verifica na Fig.1), sendo os seus terrenos influenciados pelas águas do Rio, principalmente a zona das Lezírias (número 7 da Fig.2). O Rio Tejo recebe vários afluentes localizados neste concelho, como águas provenientes de estações de tratamento de indústrias e de estações de tratamento de águas residuais públicas. Estas, são influências importantes, não só pelo elevado número de habitantes no concelho, mas também pelo número de empresas (3.546) ali sedeadas (Soares *et al.*, 2004).

No sentido de avaliar o impacto destes afluentes na qualidade microbiológica da água do Rio Tejo, foram seleccionadas para monitorização (presença/ausência de indicadores bacteriológicos) 7 linhas de água do concelho de Vila Franca de Xira, num total de 10 locais de amostragem situados em afluentes sujeitos a influências diversas, como descargas industriais, zonas urbanizadas, rurais e agrícolas.

Os afluentes seleccionados foram, (A) Vala do Carregado, (B) Vala de descarga da Central Eléctrica, (C) Vala de descarga da Fábrica de Tomate, (D) Rio Grande da Pipa, (E) Ribeira da Alfarrobeira/Verdelha, (F) Riacho do Estaleiro e (G) Vala Mar de Cães (Lezírias).

- **Indicadores microbiológicos**

A água não é um meio de cultura especialmente bom para os microrganismos patogénicos, contudo, estes podem viver e proliferar através desta (World Health Organization, 2001) a diferentes profundidades (Baldy-Chudzik *et al.*, 2003). As águas mais propícias para a proliferação e desenvolvimento destas formas de vida são as águas residuais (Fresenius *et al.*, 1988), o que significa que podemos encontrar bactérias fecais em águas de esgotos tratadas ou não tratadas, assim como em descargas directas de urbanizações, zonas rurais e industriais, ou ainda de locais de criação animal (Vinten *et al.*, 2008).

Para o estudo da presença/ausência de bactérias patogénicas utilizam-se microrganismos designados de “indicadores”, que têm sido usados para avaliar a qualidade microbiológica da água (Yates, 2007). Estes organismos estão normalmente associados ao tracto intestinal e quando são detectados na água constituem uma evidência de contaminação orgânica.

Um indicador bacteriológico ideal deverá correlacionar-se com a presença de bactérias patogénicas, apresentando um perfil de sobrevivência semelhante (Field *et al.*, 2007). Os indicadores de poluição fecal mais comuns são os microrganismos que estão presentes nas fezes e que, idealmente, são incapazes de se reproduzir fora do intestino animal. Os microrganismos entéricos e patogénicos devem desaparecer da água algum tempo após o evento de contaminação (Cimenti *et al.*, 2007), contudo algumas destas bactérias patogénicas são conhecidas por permanecerem vários meses no meio ambiente (Byappanahalli *et al.*, 2003; Wery *et al.*, 2008). Factores ambientais como a salinidade, temperatura, nutrientes e luz, podem influenciar a sobrevivência e proliferação destes microrganismos (Stewart *et al.*, 2008).

Os organismos mais utilizados como indicadores pertencem ao grupo dos coliformes. Este grupo é composto por indivíduos anaeróbios-facultativos, Gram-negativos, não-formadores-de-esporos e fermentadores de lactose (Tallon *et al.*, 2005). Devido à elevada abundância destes indicadores nas fezes, a sua presença na água indica o nível de contaminação fecal e o risco da presença de microrganismos patogénicos (Garcia-Armisen *et al.*, 2007).

Indicadores tradicionais, como Coliformes fecais e Enterococos, têm uma longa utilização no que respeita à segurança microbiológica e à qualidade das águas potáveis e residuais (Sidhu *et al.*, 2009). Os Coliformes fecais estão incluídos no grupo dos coliformes totais, sendo consideradas bactérias coliformes termotolerantes e produtoras de gás a 44°C (Rompere *et al.*, 2002; Tallon *et al.*, 2005).

As estirpes de *Escherichia coli* (Coliforme fecal) estão presentes no grupo de microrganismos que constituem a flora intestinal de animais endotérmicos, cuja função consiste em assegurar o correcto funcionamento do sistema digestivo (Czajkowska *et al.*,

2008). Estas são produtoras de indol a partir do triptofano e portadoras da enzima β -glucuronidase (presente em 94-97% das estirpes). Estes são organismos desde há muito utilizados como indicadores de poluição fecal, contudo a sua presença ou o aumento de densidade não indica a origem da fonte de poluição (Field *et al.*, 2007; Haack *et al.*, 2009; Bidyut R. Mohapatra *et al.*, 2007). É importante estudar a presença específica de *Escherichia coli*, pois outros organismos ditos coliformes fecais (termotolerantes) poderam não ser de origem fecal. Assim, actualmente alguns investigadores suportam a transição da designação “Coliformes fecais” para “Coliformes termotolerantes” (Tallon *et al.*, 2005).

Algumas bactérias patogénicas são mais resistentes aos tratamentos convencionais de águas residuais do que *E. coli*, como por exemplo *Enterococcus faecalis*, que sendo mais resistentes, poderão ser usadas como controlo (Salgot *et al.*, 2006). Deste modo, em adição ao estudo dos Coliformes, podemos ainda determinar a presença/ausência de Enterococos, também considerados indicadores de poluição fecal (Winward *et al.*, 2008). Os Enterococos são todos Streptococci fecais, Gram-positivos, Catalase-negativos, e crescem a 44°C (Tallon *et al.*, 2005). Contudo, estes indicadores tradicionais apresentam algumas limitações, sendo uma delas a sua incapacidade de distinguir a origem da fonte de poluição, se animal ou humana (McQuaig *et al.*, 2006). Em 1976, devido à insistente procura de um método rápido e de fácil identificação da origem da poluição fecal, foi sugerido um método que se baseava na razão entre Coliformes fecais e Enterococos (Meays *et al.*, 2004). No entanto, pouco tempo depois foi demonstrado que os factores ambientais podem alterar este rácio, mostrando que este não é um método fidedigno (Chou *et al.*, 2004). Actualmente, existem sugestões para indicadores alternativos, que poderão identificar melhor os riscos para a saúde pública e promover melhores estratégias de monitorização (Stewart *et al.*, 2008). Indicadores do grupo dos Colífagos estomacais ou bacteriófagos F-RNA-específicos são algumas das alternativas, podendo indicar também a presença de vírus ou organismos protozoários patogénicos (Costan-Longares *et al.*, 2008).

- **Metodologias**

Monitorização da qualidade microbiológica da água

O aumento das preocupações relacionadas com águas residuais, o constante aumento do número de estações de tratamento e a necessidade de reutilizar estas águas, forçou o uso de técnicas mais sofisticadas e precisas para a sua reutilização (Salgot *et al.*, 2006).

Para um controlo periódico, seria impraticável a nível logístico monitorizar a água no que diz respeito a todos os microrganismos patogénicos (Leclerc *et al.*, 2001). Devido às limitações da monitorização directa de agentes patogénicos, o estudo de Coliformes totais/fecais e Enterococos é a opção mais viável para a monitorização das águas (Field *et al.*, 2007). Os métodos desenvolvidos para a detecção destes indicadores são rápidos e fáceis de executar e envolvem custos relativamente baixos quando comparados com metodologias destinadas a outros indicadores microbiológicos.

Animais de espécies diferentes contêm rácios diferentes de *E. coli* e *Enterococcus* associados ao conteúdo intestinal. Este facto torna difícil estimar a contribuição em *E. coli* e *Enterococcus* das diversas fontes de contaminação quando estas se misturam (Field *et al.*, 2007). Por outro lado, o facto de os indicadores serem baseados nas suas concentrações fecais não demonstra a origem da contaminação, pois algumas estirpes podem ser residentes, principalmente algumas bactérias do grupo dos coliformes (World Health Organization, 2001), podendo mesmo multiplicar-se em condições favoráveis (Stewart *et al.*, 2008).

Estudos sobre a sobrevivência das bactérias demonstraram que o sedimento apresenta melhor capacidade como “meio de cultura” relativamente à água, indicando que os sedimentos promovem protecção contra, por exemplo, variações de temperatura ou radiações solares. Deste modo, sempre que os terrenos são lixiviados quer pelas águas de regas quer pelas chuvas, poderá ocorrer um influxo de bactérias nas linhas de água adjacentes (Brownell *et al.*, 2007).

Os indicadores tradicionais, Coliformes totais/fecais e Enterococos, continuam a ser reconhecidos e aceites como indicadores para avaliação da eficácia de tratamentos e processos de desinfecção das águas (Tallon *et al.*, 2005).

Actualmente, a qualidade das águas tratadas é regulamentada por normas específicas baseadas na determinação de níveis de bactérias coliformes (Costan-Longares *et al.*, 2008), entre outros como *Clostridium perfringens* e Enterococos (Field *et al.*, 2007). O método padrão utilizado para a detecção e quantificação de *E. coli* e bactérias coliformes em água com membranas de filtração é baseado na definição convencional de que os coliformes são

organismos capazes de fermentar lactose com produção de ácido a 37°C (Pitkanen *et al.*, 2007).

O procedimento utilizado, descrito no Decreto-Lei n.º 236/98, envolve a utilização de meios específicos e diferenciais (neste caso TTC Tergitol e Chromocult® Coliform Agar para Coliformes, e Slanetz & Bartley para Enterococos) para a contagem de microrganismos indicadores. As amostras devem ser diluídas ou, quando apropriado, concentradas a fim de que o número de unidades formadoras de colónias fique compreendido entre 10 e 100 (Portugal, 2005).

Estes métodos apresentam algumas limitações, como a duração do período de incubação, a interferência de organismos antagónicos, falta de especificidade do grupo dos coliformes e um baixo nível de crescimento para os coliformes de crescimento lento ou sob stress. Desta forma, somente uma pequena fracção, 0,1 a 15%, do total da população bacteriana pode ser enumerada através do método de meios de cultura (Rompre *et al.*, 2002). Contudo, continuam a ser métodos fiáveis e utilizados pela legislação em vigor para a monitorização da qualidade da água destinada ao consumo e lazer.

Identificação das fontes de poluição fecal

Actualmente uma das grandes preocupações na monitorização e regularização das linhas de água é a ausência do conhecimento das fontes de contaminação. Quando estas são fontes de contaminação pontuais, é relativamente mais fácil a detecção e posterior regularização. Quando são fontes de poluição difusas, ou seja, uma mistura de várias fontes, o problema aumenta de complexidade.

Para que se possa identificar a fonte de poluição é necessária a utilização de outros métodos, sendo estes designados de *Source Tracking* (ST). Esta abordagem pode ser realizada através de várias metodologias, químicas ou biológicas. Sendo estas metodologias recentes, as biológicas são as mais utilizadas, pois um dos grandes problemas das metodologias químicas é o facto dos seus indicadores se dissolverem com muito mais facilidade na água do que os indicadores ou marcadores biológicos. Por exemplo, uma das metodologias químicas envolve a detecção da cafeína, este permite a localização de contaminação de origem fecal humana, sendo difícil de identificar quando dissolvida em grandes quantidade de água (Scott *et al.*, 2002). Pelo contrário, os métodos biológicos são mais discriminatórios e eficazes quando se lida com locais em que a poluição fecal se encontra mais diluída (Meays *et al.*, 2004)

Os métodos de *Microbial Source Tracking* (MST) baseiam-se na detecção de um marcador/indicador microbiano, que poderá ser utilizado de modo a obter uma caracterização

completa de uma determinada contaminação orgânica (Cimenti *et al.*, 2007). Os indicadores biológicos de contaminação orgânica são organismos de origem fecal (bactérias, vírus e protozoários) que, através de diversas metodologias, podem fornecer perfis específicos de cada tipo de contaminação fecal. Estes deverão apresentar as mesmas características que os indicadores da qualidade da água, além de incluírem um elevado poder discriminatório da fonte de contaminação (Meays *et al.*, 2004). Os indicadores mais utilizados em MST são: *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Bacteroides* e *Bifidobacterium*. Contudo, devido ao facto de *E. coli* e *Enterococcus* serem espécies mais facilmente cultiváveis, são as mais utilizadas como indicadores de MST (Simpson *et al.*, 2002).

Os marcadores de poluição fecal são regiões específicas presentes no DNA de indicadores fecais, como exemplificado na tabela 1.

Tabela 1. Exemplos de três marcadores específicos para contaminação fecal humana (Harwood *et al.*, 2009).

Indicador	Região específica	Primers: sequência do marcador
HPyV (<i>poliomavírus de humanos</i>)	Antigénio T conservado	SM2: 5'AGT CTT TAG GGT CTT CTA CCT TT 3'
<i>Bacteroidales</i>	16S rRNA	Bac32f: 5'AAC GCT AGC TAC AGG CTT 3'
<i>Bacteroidales</i> associados a Humanos	16S rRNA	HF183f: 5'ATC ATG AGT TCA CAT GTC CG 3'
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	nifH	Mnif342f: 5'AAC AGA AAA CCC AGT GAA GAG 3'

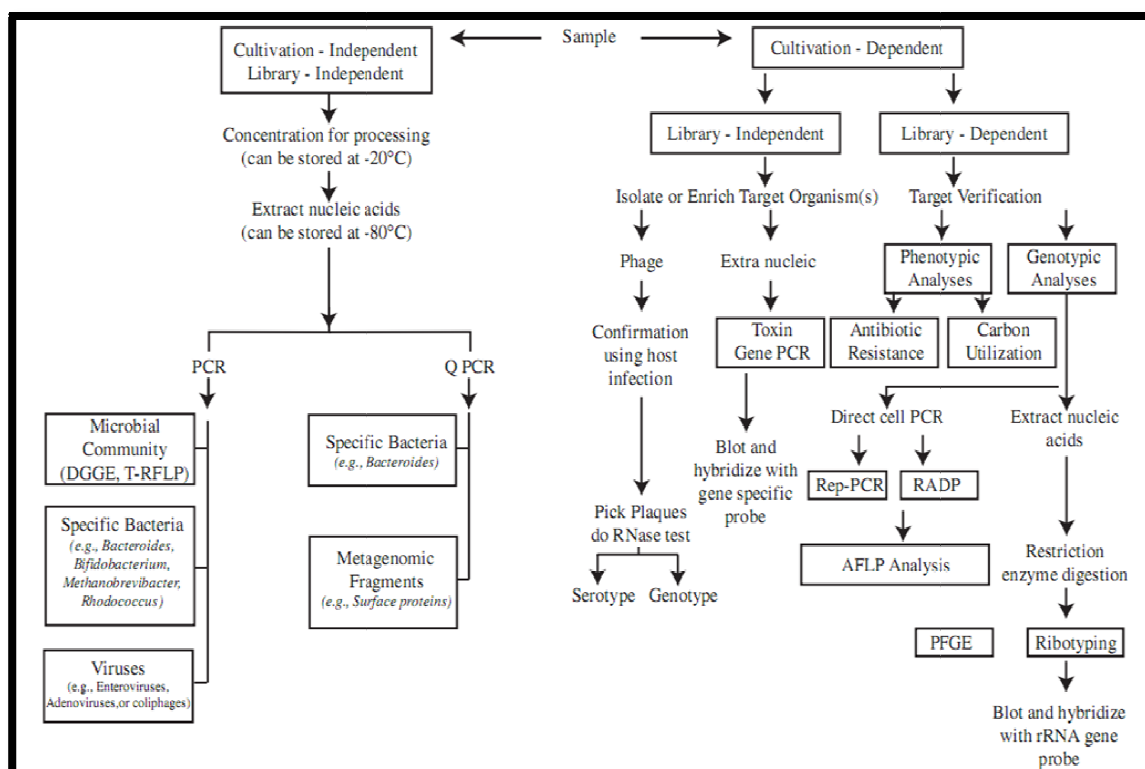
Estes métodos apoiam-se na hipótese de que diferentes espécies animais contêm estirpes distintas. Assim, comparando estirpes isoladas em ambientes contaminados com estirpes isoladas de fontes conhecidas, hipoteticamente, permite identificar a fonte de contaminação (Anderson *et al.*, 2006). Contudo, a diversidade pode ser afectada pela dieta do hospedeiro e pelas variações abióticas às quais este está sujeito, de modo que, diferentes regiões geográficas podem conter diferentes recursos para a dieta animal, o que implica que as populações de um determinado indicador possam apresentar variabilidade espacial (Hansen *et al.*, 2009).

Na tabela 2, estão referenciadas algumas das metodologias mais utilizadas para MST, químicas e biológicas, bem como algumas vantagens/desvantagens da utilização das mesmas.

Tabela 2. Comparação de métodos utilizados para MST (adaptado de: Meyas et al., 2004; Seurinck et al., 2005)

Método	Vantagens	Desvantagens
Ribotipagem (Ribotyping)	Altamente reprodutível	Complexo
		Caro
		Laboroso
	Classifica isolados de múltiplas fontes	Específico para cada região geográfica
		Requer uma base de dados
PFGE (Pulse-field gel electrophoresis)	Extremamente sensível a pequenas variações genéticas	Poderá ser sensível de mais para uma discriminação mais abrangente da fonte
	Altamente reprodutível	Técnica demorada
		Requer uma base de dados
Rep-PCR (Repetitive DNA sequences)		Baixa reprodutibilidade
	Simples e rápido	Requer crescimento de culturas
		Requer uma grande base de dados
LH-PCR (Length heterogenetic PCR)	Não necessita de culturas ou base de dados	Equipamento caro que requer técnicos especializados
T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism analysis)	Não necessita de culturas ou base de dados	Equipamento caro que requer técnicos especializados
Host-specific 16S rDNA	Não necessita de culturas ou base de dados	Testado somente para contaminação humana, outras ainda em estudo
	Indica contaminação recente	Equipamento caro que requer técnicos especializados
ARA (Antibiotic Resistance Analysis)		Dependente de Base de dados
	Rápido	Geográfica e temporalmente variável
	Pode ser utilizado para discriminar diferentes fontes de poluição fecal	Não quantitativo
Fonte de Carbono Utilizada		Dependente de Base de dados
		Baixa reprodutibilidade
	Rápido	Geográfica e temporalmente variável
		Não quantitativo

As metodologias utilizadas em MST podem ser divididas em dois grupos principais, dependentes do cultivo ou independentes do cultivo. Dentro dos métodos dependentes de cultura, podemos referenciar um subgrupo, os métodos que dependem de uma base-de-dados e os que não dependem. Pode-se definir base-de-dados como conjunto de indicadores ou marcadores isolados a partir de amostras de origem fecal conhecida, usando um método de discriminação de MST específico (Field *et al.*, 2007). Cada base-de-dados é específica para cada metodologia utilizada. Na figura 3 está representado um esquema que contém alguns dos métodos mais utilizados em MST e os grupos nos quais se inserem.



omingo *et al.*, 2007)

Neste trabalho foi utilizada a técnica *Repetitive DNA Sequences - Polymerase Chain Reaction* (Rep-PCR) para distinguir diferentes genótipos de *E. coli* de amostras de água. Este é um método de MST genotípico que se baseia na utilização de sequências oligonucleotídicas indicadoras complementares de sequências de DNA repetitivas muito conservadas e dispersas pelo genoma da maioria das bactérias (B. R. Mohapatra *et al.*, 2007). Este método relativamente simples de executar tem mostrado um elevado poder discriminatório, relativamente outros métodos de PCR, apresentando-se como uma boa ferramenta na análise da diversidade em estudos de ecologia microbiana, microbiologia ambiental e diagnósticos moleculares (Ishii *et al.*, 2009).

Existem três famílias de Rep-PCR dependendo dos *primers* utilizados: sequências *Repetitive Extragenic Palindromic* (REP), sequências *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC) e sequências BOX. Estas regiões repetidas são altamente conservadas devido ao facto de se propagarem como DNA “egoísta”, o que significa que são muito menos susceptíveis de sofrerem mutações ou de se “perderem” na replicação do DNA (Seurinck *et al.*, 2005). De acordo com Scott e colaboradores (2002), o *primer* REP gera resultados com baixo nível de complexidade, o *primer* ERIC é mais sensível a variações nas condições do PCR, como na presença de contaminantes, e o *primer* BOX é o melhor dos três, no caso de se desejar um maior detalhe e “fingerprints” mais robustos. Para a análise de *E. coli*, os *primers* de REP e BOX são os mais recomendados (Mohapatra *et al.*, 2008).

Mesmo com os melhores e mais robustos métodos para a identificação e monitorização das fontes de contaminação orgânica, continua a ser difícil proteger os recursos hídricos e gerir a contaminação sem que exista uma compreensão da dinâmica dos indicadores no ambiente natural (Meays *et al.*, 2004). Essa dinâmica é a forma como os indicadores se comportam dependendo das características abióticas do ecossistema. Assim, cada local contaminado é específico e poderá influenciar os indicadores presentes, sendo este um dos grandes problemas associados às metodologias de *Microbial Source Tracking*.

- **Objectivo**

Actualmente, o Rio Tejo tem sido afectado por diversos tipos de poluição, como comprovado por estudos sucessivos realizados pelo SNIRH. Sendo esta uma Zona de Protecção Especial de elevada importância internacional, a sua monitorização e manutenção são de interesse nacional.

O objectivo do *Projecto dos Avieiros* é desenvolver projectos multidisciplinares dentro das áreas da cultura, ciência e lazer em prol do Rio Tejo. Promover assim, todas as actividades a este associadas com o propósito de voltar a ser visto como fonte de lazer e trabalho que outrora foi. De modo a cumprir este objectivo global no presente trabalho propôs-se realizar duas etapas, (1) monitorização de 7 afluentes ao Tejo seleccionados tendo em conta diversos factores visíveis de poluição orgânica, como a poluição oriunda de zonas industriais/urbanas/rurais/agrícolas; (2) tipagem de isolados de *Escherichia coli* utilizando uma metodologia de *Microbial Source Tracking*. Cada etapa apresentou objectivos parciais:

- (1) Avaliar a qualidade microbiológica dos afluentes seleccionados, de modo a localizar linhas de água que contribuam, transportando poluição orgânica, para a degradação da qualidade da água do Rio Tejo.
- (2) Tipagem dos isolados de *E. coli*, por REP-PCR, que permita localizar as fontes de poluição que existiam nas diversas linhas de água através análise da diversidade intra-específica dos isolados, isto é, saber que genótipos ou conjunto de genótipos estão associados a cada tipo de contaminação humana ou animal ou humana e animal. Esta análise pretende contribuir para localizar as fontes de poluição nas linhas de águas quando estas (fontes de poluição) se misturam, fazendo com que possam ser tomadas medidas de monitorização das fontes de poluição e, por consequente, melhorar a qualidade da água dos afluentes.

Material e Métodos

- ***Locais de amostragem***

Devido ao elevado número de linhas de água existentes no Concelho de Vila Franca de Xira houve a necessidade de escolher apenas alguns pontos de amostragem. Assim, a escolha teve como base três parâmetros essenciais, (1) diferentes fontes de contaminação: industrial, urbana, rural e agrícola; (2) ser afluente do Rio Tejo; e (3) acessibilidade ao local de amostragem.

- **(A) Vala do Carregado**: é um prolongamento da linha de água do Rio Grande da Pipa, que se estende até ao Rio Tejo, influenciado por zonas urbanizadas, rurais e agrícolas, de fácil acesso.



.pt/) e 2-

- **(B) Vala da Central Eléctrica**: linha de água de descargas legais de águas residuais tratadas da central eléctrica. Esta linha de água é artificial, construída em cimento, e desagua directamente no Rio Tejo.



Figura 5. 1-Localização da linha de água B (in: <http://maps.google.pt/>) e 2-fotografia da linha de água B.

- **(C) Descargas da Fábrica de Tomate:** linha de água de descargas legais, de águas residuais da Fábrica de Tomate, que desagua imediatamente no rio Tejo.



.pt/) e

- **(D) Rio Grande da Pipa:** Linha de água que delimita a zona norte do concelho de Vila Franca de Xira, influenciada por zonas rurais e agrícolas.



Figura 7. 1-Localização da linha de água D (in: <http://maps.google.pt/>) e 2-fotografia da linha de água D.

- **(E₀) Rib^a da Alfarrobeira:** afluente da Ribeira da Verdelha, fortemente influenciada por zonas urbanizadas, apresentando bons acessos.



pt/)

- **(E_b) Rib^a da Verdelha:** afluente do Rio Tejo de grande versatilidade, influenciado por diversos factores, como rurais, industriais, agrícolas ou urbanos. Linha de água longa, de acesso relativamente fácil.

Nota: Entre os locais de amostragem E_a e E_b, são efectuadas descargas de águas residuais legais, que por sua vez se acumulam na Ribeira da Verdelha até desaguiarem no Rio Tejo.



Figura 9. 1-Localização da linha de água E_b (in: <http://maps.google.pt/>) e 2- fotografia da linha de água E_b.

- **(F_{a/b}) Riacho do Estaleiro:** linha de água modificada nitidamente afectada pelo Homem. Influenciada por zonas agrícolas e urbanizadas.



n:

- **(G_{a/b}) Vala Mar de Cães:** esta vala caracteriza-se por ser artificial (mas não em cimento), tendo como função a rega dos campos agrícolas das Lezírias de Vila Franca de Xira. Tem início na zona norte das Lezírias (zona a), tendo como fonte de água o Rio Tejo, e termina na zona sul (zona b), percorrendo toda a Lezíria.

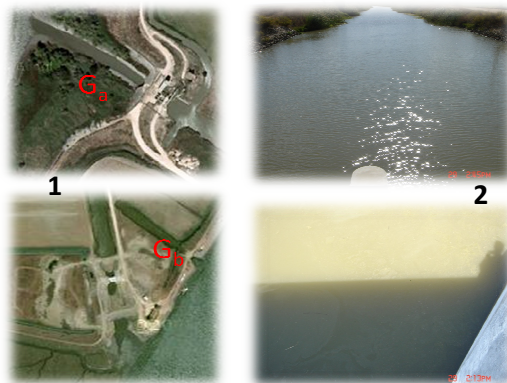


Figura 11. 1-Localização da linha de água G_{a/b} (in: <http://maps.google.pt/>) e 2-fotografia da linha de água G_{a/b}.

- ***Amostragem***

As amostragens seguiram sempre o mesmo procedimento. Utilizaram-se frascos de mergulho estéreis que recolheram a amostra a uma profundidade média de 30 cm, tendo sido posteriormente transportadas numa mala térmica opaca, a uma temperatura de aproximadamente 4 °C, até ao laboratório, não demorando mais de 2 horas entre a colheita e o tratamento da amostra.

No laboratório as amostras foram tratadas individualmente, mantendo a ordem da colheita.

- ***Metodologias***

Monitorização das linhas de água

Filtração

No tratamento das amostras a primeira etapa foi a diluição com peptona salina em três factores de diluição (estes factores foram estudados e otimizados individualmente para cada linha de água). Seguidamente, filtrou-se 1 mL de cada uma das diluições utilizando membranas de filtração de 0,45 µm.

As membranas de filtração foram posteriormente colocadas em placas de Petri com meios indicados para cada grupo de organismos, ou seja, meio de Chromocult® Coliform Agar no caso

de a pesquisa ser direccionada para Coliformes totais e *E. coli* e, meio de Slanetz & Blartley para a pesquisa de Enterococos.

As placas foram incubadas de acordo com as exigências dos organismos e dos meios de cultura, $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h para os Enterococos, e $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h para o estudo de Coliformes totais e *E. coli*.

Durante o estudo foram usados dois meios de cultura diferentes para crescimento de Coliformes totais e fecais. Houve necessidade de se proceder a uma alteração de meios. Numa primeira fase utilizou-se o meio de TTC Tergitol (Anexo I), e posteriormente o Chromocult® Coliform Agar (Anexo II). Essa alteração deveu-se à constatação de que o meio TTC Tergitol não seria o mais indicado para este tipo de investigação, pois é um meio utilizado para águas que se espera não estejam contaminadas, como água potável. Deste modo, o meio Chromocult® Coliform Agar enquadra-se melhor neste estudo segundo um padrão preço/qualidade de resultados, sendo o meio mais utilizado para águas muito contaminadas, e o ideal para a identificação de *Escherichia coli* (Finney *et al.*, 2003).

Decorrido o tempo de incubação, efectuaram-se as contagens das colónias existentes nas placas de cada grupo de organismos, exceptuando as que nitidamente ultrapassavam as 80 Unidades Formadoras de Colónias (UFC's).

O método utilizado durante a realização do trabalho experimental foi baseado no método publicado em Diário da República - I Série-A, nº 176, 1998, utilizando os meios anteriormente discritos.

Além dos parâmetros microbiológicos foram realizadas algumas análises químicas, nomeadamente CQO (Carência Química de Oxigénio), Oxidabilidade, Oxigénio disponível, Salinidade, Temperatura, pH e Turvação.

Isolamento e purificação de *E. coli*

Com o meio TTC Tergitol as colónias de Coliformes fecais crescidas as 44°C foram submetidas a testes de confirmação, vulgarmente utilizados para comprovar se estamos na presença de isolados de *E. coli*. Os testes utilizados neste trabalho foram (1) a fermentação da lactose, (2) o teste da oxidase e (3) o teste do indol.

- (1) *Fermentação da lactose*: a membrana com o filtrado é incubada no meio TTC Tergitol a $44^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 24h. As colónias de cor alaranjada e com forma de “ovo estrelado” têm de formar uma aura de cor amarelada no meio de cultura. O facto destas colónias fermentarem a lactose com produção de gás, constitui um

teste importante para as distinguir de outros microrganismos gram (-) com forma de bastonete.

- (2) *Teste da oxidase*: as colónias isoladas são repicadas para placas de Petri com *Tryptone Soy Agar* (TSA) e incubadas a 37 °C durante 24 h. Com uma ansa estéril, coloca-se uma colónia sobre um disco de teste de oxidase estéril, previamente humedecido com reagente de oxidase, dentro de uma caixa de Petri vazia. Se der coloração violeta, então é oxidase (+), se não houver alteração de cor então oxidase (-).
- (3) *Teste do indol*: as colónias são inoculadas em meio *Tryptophan Broth* (TB) num tubo de vidro, e incubadas a 44 °C durante 24 h. Posteriormente, colocam-se 3 gotas de reagente *Kovacs* nos respectivos tubos e verifica-se se há reacção (aparecimento de um anel de cor vermelha).

Isolados positivos para a fermentação da lactose, oxidase negativos e indol positivos foram considerados como estirpes de *Escherichia coli*.

Com o meio Chromocult® Coliform Agar não existe a necessidade de utilizar testes de comprovação, pois o meio selecciona as colónias que corresponderão a estirpes de *E. coli* pela cor (azul-escuro/violeta). De seguida, é necessário proceder à purificação dos isolados. Seleccionam-se as colónias com a cor indicada utilizando um palito estéril e repicam-se novamente em placas com o meio Chromocult® Coliform Agar de modo a confirmar que estão isoladas.

Uma vez isoladas, as culturas foram repicadas em placas de TSA e armazenadas a 4°C até futura utilização.

Criopreservação

Culturas frescas dos isolados foram conservadas em meio *Tryptone Soy Broth* (TSB) com 15% de glicerol armazenadas a -80 °C.

Cálculo estatístico

Para a realização de uma discussão científica e conclusiva, foi necessário recorrer ao cálculo estatístico, as equações utilizadas apresentam-se no Anexo III. Para tal, efectuou-se um teste ANOVA. Este procedimento foi necessário para verificar se existem diferenças significativas entre as amostras, de modo a poder comparar os seus índices de poluição. O teste ANOVA *One-Way* foi o escolhido devido ao facto de ser o mais rápido e eficaz para o tratamento de dados numa experiência com mais de duas amostras.

Nos casos em que se comprovou existirem diferenças significativas entre as médias do conjunto das amostras, efectuou-se o teste de Tukey, que permite verificar se dentro de grupos de duas amostras seleccionadas essas diferenças se mantêm, avaliando-se deste modo se os índices de poluição dessas amostras são semelhantes.

Tipagem dos isolados por REP-PCR

A partir dos isolados armazenados a -80 °C prepararam-se culturas em placas de TSA que foram incubadas a 37 °C, durante 18 h. Todos os isolados foram ressuspensos em água estéril (2 a 3 colónias em 100µl de água estéril) e utilizados como DNA molde na mistura de PCR.

Condições de PCR

Os perfis de REP-PCR foram obtidos utilizando o par de primers REP1R (5'-III ICGICG ICA TCI GGC-3') e REP2I (5'-ICG ICT TAT CIG GCC TAC-3') (Mohapatra *et al.*, 2008). As reacções de PCR foram preparadas misturando 1 µl de cada um dos primers (50 pmol/µL), 11,15 µL de H₂O, 3 µL de MgCl₂ (25mM), 1,5 µL de dNTP's (2mM), 5 µL de Buffer (5x concentrado), 1,25 µL de DMSO, 0,1 µL Tap Polimerase (5 U/µL) e 1,0 µL de suspensão de células, num volume total de 25 µL. Em cada conjunto de amostras amplificadas foi incluído um controlo negativo, substituindo a suspensão de células por igual volume de água e dois controlos positivos. Todos os reagentes de PCR são da marca Promega (Promega Corporation, Madison, USA), à excepção dos dNTP's que são da marca Bioron (Bioron Ltd., Singapore). As reacções de PCR decorreram num termociclador Bio-Rad MyCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

As condições de amplificação utilizadas foram as seguintes: temperatura inicial de desnaturação de 95°C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto mais 40°C durante 1 minuto para se realizar o *annealing* e 8 minutos a 65°C para a extensão das cadeias, seguida de uma extensão final a 65°C durante 16 minutos (adaptado de Baldy-Chudzik e colaboradores (2003)).

Electroforese de DNA

Os produtos da reacção de PCR foram separados em géis de 1,5 % de agarose (Lonza, Rockland, USA) a 80V, durante 3:15h em tampão de TAE 1x (Tris(hidroximetil)-aminometano) (5Prime, Gaithersburg, USA). As amostras (10ul) foram carregadas no gel após a adição de 1/6 do volume de tampão de carga. O tamanho de fragmentos lineares de DNA foi determinado por comparação com a migração de padrões de peso molecular conhecido.

TAE 50x

40 mM Tris base

40 mM Acetato

2 mM EDTA

(pH 8,0)

Tampão de carga 6x

0,25% bromofenol

0,25% xileno cianol

40% sacarose ou 30% glicerol

(pH 8,0)

Visualização do DNA

Os géis foram corados numa solução de brometo de etídeo (EtBr) a 0,5 µg/mL, durante 20 minutos e visualizados num transiluminador de luz UV e digitalizados num sistema de aquisição de imagem o G:BOX da Syngene (Cambridge, United Kingdom).

Análise dos perfis de bandas

As imagens dos géis foram analisadas utilizando o programa *Gel Compare II* (Applied Maths, Belgium). A matriz de similaridade foi calculada utilizando o coeficiente de Pearson com uma tolerância de 1% e uma optimização de 1,60% para a análise da similaridade genética. A análise de “clustering” da matriz de similaridade foi efectuada pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages) (Ishii *et al.*, 2009).

Para o auxílio da discussão dos resultados foram utilizadas algumas ferramentas do programa PRIMER 6 (PRIMER-E Ltd, Ivybridge, UK).

Resultados e Discussão

Monitorização das linhas de água em estudo

A primeira fase deste trabalho teve como objectivo verificar a qualidade microbiológica da água, proveniente das sete linhas de água do concelho de Vila Franca de Xira em estudo. Especificamente, pretendia-se caracterizar estas linhas de água quanto ao nível de poluição fecal. Para tal, foram analisados parâmetros biológicos, Coliformes totais, Coliformes fecais, *E. coli* e Enterococos, e parâmetros físico-químicos, CQO, oxigénio disponível, pH, salinidade, turvação, nitratos, oxidabilidade e temperatura.

Os resultados apresentados correspondem à média representativa de 3 réplicas para cada indicador microbiológico, sendo expressos em UFC's por 100 ml de água. Os valores máximos de referência para as análises químicas e biológicas admitidos por lei para águas de consumo/residuais, foram retiradas do Diário da República - I Série-A, nº 176, 1998.

Os dados obtidos para as diferentes linhas de água foram comparados com os valores existentes na tabela 3, elaborada pelo SNIRH. Esta entidade estabelece uma classificação à qualidade da água estudada (excelente, boa, razoável ou má) tendo em conta uma escala de valores de UFC's/100ml para os diferentes parâmetros. A referida classificação constitui um auxílio à discussão dos resultados obtidos neste trabalho, uma vez que não existe nenhum Decreto-lei que classifique as águas como poluídas.

Tabela 3. Classificação relativa à qualidade da água estudada tendo em conta uma escala de valores de UFC'S/100ml para os diferentes parâmetros.

Parâmetro	Unidades	A		B		C		D	
		Excelente		Boa		Razoável		Má	
		MIN	MAX	MIN	MAX	MIN	MAX	MIN	MAX
Coliformes totais	UFC's / 100 mL	-	50	-	5000	-	50000	-	>50000
Coliformes fecais	UFC's / 100 mL	-	20	-	2000	-	20000	-	>20000
Estreptococos fecais	UFC's / 100 mL	-	20	-	2000	-	20000	-	>20000

Como referido nos “Materiais e Métodos” houve a necessidade de alterar o meio que se utilizava para os Coliformes totais/fecais e *E. coli*. Contudo, na passagem do meio TTC Tergitol para o Chromocult® Coliform Agar, perdeu-se a possibilidade de contabilizar as UFC's para os Coliformes fecais, pois o Chromocult® Coliform Agar só diferencia as bactérias *E. coli* das restantes Coliformes totais.

(A) – Vala do Carregado

As médias 1, 2 e 3 foram executadas com o meio TTC Tergitol, e as médias 4, 5 e 6 foram realizadas com o meio Chromocult® Coliform Agar. Através da análise da tabela 4 podemos afirmar que a alteração dos meios não contribuiu para alterar significativamente os resultados bacteriológicos desta linha de água.

Tabela 4. Valores da contagem dos diferentes indicadores em 6 colheitas da linha de água A - Vala do Carregado. x - incontável

Indicador	(1) Média	(2) Média	(3) Média	(4) Média	(5) Média	(6) Média	Médias
Bacteriológico	UFC/100mL	UFC/100mL	UFC/100mL	UFC/100mL	UFC/100mL	UFC/100mL	
Coliformes totais	x	50000	39000	51200	47300	48600	47220
Coliformes fecais	x	20000	8066	-	-	-	14033
Enterococos	x	3800	5500	12000	4200	100	5120
<i>E. coli</i>	x	20000	8066	6200	3300	2100	7933

A variação nos dados da linha de água A demonstrados na tabela 2 é plausível, pois esta é influenciada por vários factores ambientais e humanos, sendo eles agrícolas, rurais e urbanos (factores que estão supostamente presentes).

Segundo o Anexo I do Decreto-lei 236/98, que se refere à legislação estabelecida sobre a qualidade da água para consumo, poder-se-ia utilizar esta água doce para fins de consumo humano. Pois, os valores de coliformes não ultrapassam os valores máximos admitidos (50 000 UFC's/100 mL) para a aplicação de um tratamento classe A3 (este é o tratamento máximo que se refere a águas para o uso humano, ou seja, físico, químico e de desinfecção).

Tabela 5. Parâmetros químicos determinados para a linha de água A – Vala do Carregado.

Testes Químicos	Resultado	Valor max. admitido por lei para águas residuais
CQO	302,91 mg/L O ₂	150 mg/L O ₂
Oxigénio disponível	14,53 mg/L O ₂	-
Nitratos	8,190 mg/L NO ₃	50 mg/L NO ₃
pH	7,656	-
Salinidade	0,4 ppt	-
Turvação	53,6 NTU	-
Temperatura	12°C	-

Através da análise da tabela 5, podemos verificar que esta água contém níveis de CQO bastante elevados, comparando-os com o valor máximo admitido por lei para águas residuais. Valores elevados deste parâmetro indicam que, a água transporta uma grande quantidade de matéria orgânica em suspensão, diminuindo deste modo os níveis de oxigénio disponível.

Variabilidade em Escherichia coli de águas poluídas de Vila Franca de Xira

Assim, relacionando os valores microbiológicos com os valores químicos, podemos afirmar que esta vala se encontra com níveis de poluição orgânica elevados.

(B) – Vala da Central Eléctrica

Esta é uma linha de água artificial em cimento, cujo objectivo é a descarga de águas residuais directa para o Tejo, não sendo, supostamente, influenciada pelas escorrências dos terrenos adjacentes.

Tabela 6. Valores da contagem dos diferentes indicadores em 6 colheitas da linha de água B – Vala da Central Eléctrica.

Indicador	(1) Média	(2) Média	(3) Média	(4) Média	(5) Média	(6) Média	Médias
Bacteriológico	UFC/100mL	UFC/100mL	UFC/100mL	UFC/100mL	UFC/100mL	UFC/100mL	
Coliformes totais	9900	7000	10000	14400	74350	23033	27375
Coliformes fecais	1200	934	1733	-	-	-	1289
Enterococos	500	300	866	800	4600	533	1528
<i>E. coli</i>	250	800	1733	200	3250	200	1039

Com base na classificação do SNIRH e observando a tabela 6, poderíamos referir que esta água não iria influenciar grandemente o Tejo a nível microbiológico. Segundo o Artigo 63.º Decreto-lei 236/98, as águas de descargas devem estar mais restringidas no caso de serem feitas numa área de protecção de habitats, e neste caso o estuário de Tejo é considerado uma ZPE (Zona de Protecção Especial). Porém, o mesmo Decreto-lei não referencia valores bacteriológicos para estas águas, de modo que não podemos especificar em que valores estas águas se deveriam enquadrar.

Tabela 7. Parâmetros químicos determinados para a linha de água B – Vala da Central Eléctrica.

Testes Químicos	Resultado	Valor max. admitido por lei para águas residuais
CQO	56,1 mg/L O ₂	150 mg/L O ₂
Oxidabilidade	3,95 mg/L O ₂	-
Oxigénio disponível	15,60 mg/L O ₂	-
pH	7,885	-
Turvação	38,7 NTU	-
Temperatura	13,9°C	-
Salinidade	0,5 ppt	-

Os valores dos testes químicos (tabela 7) indicam que esta linha de água se apresenta dentro dos parâmetros químicos normativos, à excepção dos níveis de turvação. Contudo, para

este parâmetro químico não se encontra estabelecido valor máximo admitido por lei para águas residuais.

Com base nos resultados apresentados nas tabelas 6 e 7, podemos admitir que esta linha de água se encontra dentro dos parâmetros normais, tanto para os factores microbiológicos como químicos. Deste modo, as descargas efectuadas por esta linha de água não terão impacto ambiental negativo.

(C) – Descargas da Fábrica de Tomate

Tal como se pode verificar na tabela 8, os valores de UFC's dos diferentes indicadores bacteriológicos para esta linha de água, são muito díspares entre si. Esta divergência pode dever-se ao facto de esta se tratar de uma linha de água artificial, que é influenciada pelo tipo de tratamento efectuado à água residual na altura da colheita.

Tabela 8. Valores da contagem dos diferentes indicadores em 6 colheitas da linha de água C – Descargas da Fábrica de Tomate.

Indicador	(1) Média	(2) Média	(3) Média	(4) Média	(5) Média	(6) Média	Médias
Bacteriológico	UFC/100mL	UFC/100mL	UFC/100mL	UFC/100mL	UFC/100mL	UFC/100mL	
Coliformes totais	14500	1200	8000	109000	7599	3000	23883
Coliformes fecais	650	400	8000	-	-	-	3017
Enterococos	12466	500	21100	1000	500	0	5928
<i>E. coli</i>	200	200	5000	1000	533	200	1189

Tendo em conta as contagens apresentadas (tabela 8) poderá ter ocorrido uma melhoria na técnica de desinfecção a partir da 3ª colheita, uma vez que se verifica um decréscimo notório nas contagens de UFC's.

Tabela 9. Parâmetros químicos determinados para a linha de água C – Descargas da Fábrica de Tomate.

Testes Químicos	Resultado	Valor max. admitido por lei para águas residuais
CQO	0 mg/L O ₂	150 mg/L O ₂
Oxidabilidade	1,78 mg/L O ₂	-
Oxigénio disponível	11,50 mg/L O ₂	-
pH	7,771	-
Turvação	3,71 NTU	-
Temperatura	23,6°C	-

Esta linha de água encontra-se dentro dos parâmetros químicos normais (tabela 9), mostrando um bom desempenho da estação de tratamento privada.

A elevada temperatura à qual estava a água na altura da recolha poderá dever-se ao próprio processo de tratamento. Este factor poderá ser uma das causas para a sobrevivência de alguns microrganismos usados como indicadores.

(D) – Rio Grande da Pipa

Durante as colheitas 3, 4 e 5 houve um período de mau tempo, com chuvas intensas nesta zona. Após este período, seguiu-se um período de tempo ameno, no qual foi feita a 6ª colheita. Segundo Brownell e colaboradores (2007), que estudaram o impacto das águas da chuva em água costeiras, as amostras recolhidas durante os períodos de chuvas foram influenciadas por um influxo de bactérias, demonstrando que épocas de chuvas podem aumentar os índices de poluição aquática.

Tabela 10. Valores da contagem dos diferentes indicadores em 6 colheitas da linha de água D – Rio Grande da Pipa.

Indicador Bacteriológico	(1) Média UFC/100mL	(2) Média UFC/100mL	(3) Média UFC/100mL	(4) Média UFC/100mL	(5) Média UFC/100mL	(6) Média UFC/100mL	Médias
Coliformes totais	4600	4000	12000	36000	125000	41500	37183
Coliformes fecais	4500	3000	3100	-	-	-	3533
Enterococos	4400	600	3500	9000	13933	1000	5406
<i>E. coli</i>	1467	1000	3000	7000	28500	2766	7289

Os valores de UFC's apresentados na tabela 10, para todos os indicadores bacteriológicos, tendem a aumentar a partir da 2ª colheita. Este padrão pode ter sido influenciado pelas chuvas intensas e, como referido por Brownell e colaboradores (2007), estas poderão ter causado um influxo de microrganismos nas águas. Contudo, esta é uma linha de água que vem de fora do concelho, pelo que não se sabe se existirá outro tipo de influência directa, como descargas industriais, que poderão ter influenciado este aumento.

Tabela 11. Parâmetros químicos determinados para a linha de água D – Rio Grande da Pipa.

Testes Químicos	Resultado	Valor max. admitido por lei para águas residuais
CQO	56,1 mg/L O ₂	150 mg/L O ₂
Oxidabilidade	3,98 mg/L O ₂	-
Oxigénio disponível	14,51 mg/L O ₂	-
Salinidade	0,4 ppt	-
pH	7,681	-
Turvação	16,8 NTU	-
Temperatura	11,6°C	-

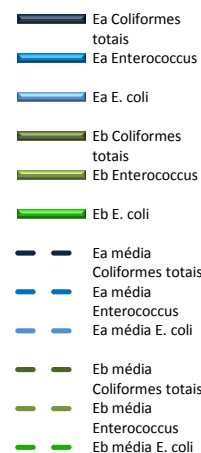
Os valores apresentados na tabela 11, relativos aos parâmetros químicos analisados, mostram que esta não é uma linha de água poluída. Assim, podemos deduzir que, no ponto de amostragem D, a água recolhida para análise se encontra dentro dos parâmetros possíveis de tratamento indicados pelo Anexo I do Decreto-lei 236/98.

(E_a) – Rib^a da Alfarrobeira e (E_b) – Rib^a da Verdelha

O ponto de amostragem E_b localiza-se no meio de uma zona industrializada, existindo descargas de águas residuais legalizadas. O ponto de amostragem E_a situa-se antes desta zona industrial. Como se pode verificar pela tabela 12, existe uma ou várias fontes poluidoras no espaço entre o local de amostra (a) e (b), sendo de frisar que a linha E_a é único afluente de E_b, que se conhece que tem descargas industriais legais.

Tabela 12. Valores da contagem dos diferentes indicadores em 6 colheitas das linhas de água E_a – Rib^a da Alfarrobeira E_b – Rib^a da Verdelha. x - incontável. S - seca.

Amostra	Indicador Bacteriológico	(1) Média UFC/100mL	(2) Média UFC/100mL	(3) Média UFC/100mL	(4) Média UFC/100mL	(5) Média UFC/100mL	(6) Média UFC/100mL	Médias
E _a	Coliformes totais	-	-	10233	116200	72666	S	66366
	Enterococos	-	-	1433	140000	6400	S	49278
	<i>E. coli</i>	-	-	233	12200	6333	S	6255
E _b	Coliformes totais	18×10 ⁶	1,5×10 ⁶	16×10 ⁶	x	75×10 ⁶	352×10 ⁶	92×10 ⁶
	Coliformes fecais	2×10 ⁶	90000	-	-	-	-	1×10 ⁶
	Enterococos	15×10 ⁶	330000	8,5×10 ⁶	155000	1×10 ⁶	200000	4,2×10 ⁶
	<i>E. coli</i>	2×10 ⁶	45000	2×10 ⁶	160000	446666	30000	78027 8



***coli*, para as linhas de as a tracejado.**

Não existem dados da 1^a e 2^a colheita de E_a porque esta zona de amostragem foi incluída depois de se ter conhecimento dos valores da linha de água E_b.

Durante a 6^a colheita foi verificado que a linha de água E_a (Rib^a da Alfarrobeira) estava seca, de modo que, não foi possível recolher nenhuma amostra. Os valores apresentados para E_b na

Variabilidade em *Escherichia coli* de águas poluídas de Vila Franca de Xira

6ª colheita são bastante alarmantes (figura 12) pois, por exemplo, apresentam uma média de 352×10^6 UFC's/100ml para os Coliformes totais, aumentando cerca de 276×10^6 UFC's/100ml em comparação com as colheitas anteriores. Combinando esse aumento de UFC's com a seca existente na linha E_a, podemos deduzir que, devido à escassez de água na linha de água E_a, as descargas efectuadas não sofreram o efeito de diluição, o que pode ter influenciado o aumento da concentração dos indicadores bacteriológicos no ponto de amostragem E_b.

Esta linha de água corre ao ar livre, e durante o resto do seu percurso até ao rio Tejo já não passa por nenhuma estação de tratamento, o que significa que este é mais um afluente que transporta directamente para Rio Tejo uma elevada carga de matéria orgânica.

Tabela 13. Parâmetros químicos determinados para a linha de água E_b – Rib^a da Verdelha.

Testes Químicos	Resultado	Valor max. admitido por lei para águas residuais
CQO	305,5 mg/L O ₂	150 mg/L O ₂
Oxidabilidade	7,98 mg/L O ₂	-
Oxigénio disponível	1,36 mg/L O ₂	-
Salinidade	1,6 ppt	-
pH	7,380	-
Turvação	50 NTU	-
Temperatura	20,3°C	-

Através da análise da tabela 13, verifica-se que a linha de água está bastante contaminada. Com base na sua leitura, podemos afirmar que é praticamente impossível a vida e sobrevivência de animais superiores, como por exemplo peixes, visto que os níveis de oxigénio disponíveis são extremamente baixos.

Outro aspecto importante é a temperatura da água no momento da recolha. A temperatura exterior rondava os 10-12 graus Célsius não sendo por isso natural que a temperatura da água fosse 20°C.

(F_{a/b}) – Riacho do Estaleiro

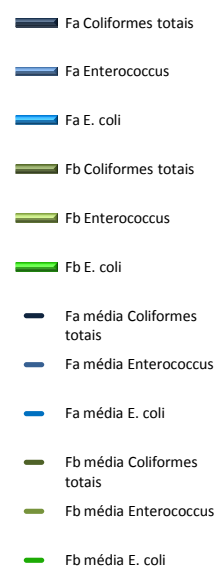
Devido à cor acastanhada e ao cheiro a esgoto, eram esperados valores elevados de poluição orgânica para a zona F_b, tendo essas expectativas sido confirmadas pelos resultados obtidos na tabela 14.

Tabela 14. Valores da contagem dos diferentes indicadores das linhas de água F_a – Riacho do Estaleiro e F_b – Riacho do Estaleiro. x - incontável

Amostra	Indicador Bacteriológico	(1) Média UFC/100mL	(2) Média UFC/100mL	(3) Média UFC/100mL	(4) Média UFC/100mL	(5) Média UFC/100mL	(6) Média UFC/100mL	Médias
F _a	Coliformes totais	-	450	4200	31750	158000	13233	41527
	Coliformes fecais	-	100	-	-	-	-	100
	Enterococos	-	150	300	11500	16300	500	5750
	<i>E. coli</i>	-	100	300	4650	144000	466	29903
F _b	Coliformes totais	108×10 ⁶	100×10 ⁶	33,2×10 ⁶	34,5×10 ⁶	13,9×10 ⁶	50,5×10 ⁶	56,7×10 ⁶
	Coliformes fecais	10×10 ⁶	10,9×10 ⁶	-	-	-	-	10,5×10 ⁶
	Enterococos	3,6×10 ⁶	6,3×10 ⁶	3,2×10 ⁶	2,4×10 ⁶	2,7×10 ⁶	3,9×10 ⁶	3,7×10 ⁶
	<i>E. coli</i>	6×10 ⁶	10,9×10 ⁶	x	14×10 ⁶	1,9×10 ⁶	7×10 ⁶	8×10 ⁶

Não existem dados da 1ª colheita de F_a porque esta zona de amostragem foi incluída depois de se ter conhecimento dos valores da linha de água F_b.

Como se pode comprovar pelos dados apresentados na tabela 14, e comparando-os com a classificação estabelecida pelo SNIRH (tabela 3), o estado de poluição desta linha de água é muito grave.



***coli*, para as linhas**

Variabilidade em *Escherichia coli* de águas poluídas de Vila Franca de Xira

Houve um importante decréscimo dos valores de F_b a partir da 3ª colheita (figura 13), o que sugere que a sensibilização efectuada por este estudo fez com que os serviços responsáveis pela linha de água actuassem, visto que todos os valores de indicadores bacteriológicos diminuíram mais de 40×10^6 UFC's/100mL de água.

Tabela 15. Parâmetros químicos determinados para a linha de água F_b – Riacho do Estaleiro.

Testes Químicos	Resultado	Valor max. admitido por lei para águas residuais
CQO	549,1 mg/L O_2	150 mg/L O_2
Oxidabilidade	8,76 mg/L O_2	-
Oxigénio disponível	2,46 mg/L O_2	-
Salinidade	0,5 ppt	-
pH	7,500	-
Turvação	116 NTU	-
Temperatura	22,3°C	-

Esta linha de água é um caso extremo no que diz respeito aos valores de turvação, CQO e temperatura, como se pode verificar na tabela 15. Em consequência, tudo indica que deverá ser difícil a sobrevivência de animais superiores e mesmo de plantas.

Os resultados mostram que este riacho é um local muito contaminado, certamente influenciado pelo Homem, através de descargas de águas residuais.

($G_{a/b}$) – Vala Mar de Cães

Estando esta linha de água em contacto directo com os terrenos em volta, e sendo uma zona de actividade pecuária intensa, poder-se-á explicar, através do factor lixiviação dos terrenos, o aumento exponencial dos valores para todos os indicadores bacteriológicos (tabela 16, colheita 3 e 4).

Tabela 16. Valores da contagem dos diferentes indicadores em 5 colheitas da linha de água $G_{a/b}$ – Vala mar de Cães. x - incontável

Amostra	Indicador Bacteriológico	(1) Média UFC/100mL	(2) Média UFC/100mL	(3) Média UFC/100mL	(4) Média UFC/100mL	(5) Média UFC/100mL	Médias
Ga	Coliformes totais	400	200	x	14300	8300	5800
	Coliformes fecais	400	100	x	-	-	250
	Enterococos	400	0	x	2858	2433	1423
	<i>E. coli</i>	400	100	x	100	100	175
Gb	Coliformes totais	200	100	x	9516	103	2480
	Coliformes fecais	0	100	x	-	-	50
	Enterococos	0	0	x	5650	11400	4263
	<i>E. coli</i>	0	100	x	216	900	304

Na colheita nº 3 foram utilizadas as mesmas diluições que nas colheitas anteriores, no entanto não foi possível proceder à contagem de colónias. Este facto poderá estar relacionado com a ocorrência de chuva na semana anterior à colheita, o que está em concordância com o enunciado por Brownell e colaboradores (2007).

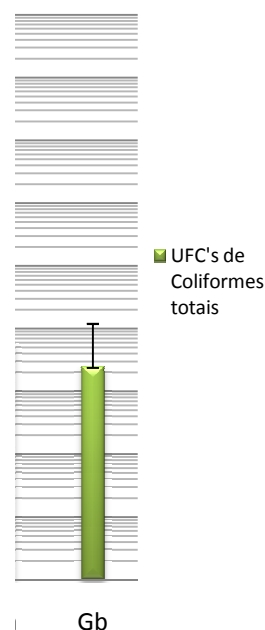
Segundo as médias apresentadas na tabela 16 podemos classificar esta linha de água como boa. Contudo, não devemos esquecer as influências a que esta linha de água está sujeita, ou seja, numa zona de agricultura intensa temos de ter em conta que estas águas poderão conter vários pesticidas que poderão influenciar os níveis de bactérias entéricas. Deste modo, as bactérias entéricas existentes poderão ser especializadas na sobrevivência neste meio, de acordo com Ng e colaboradores (2005).

Tabela 17. Parâmetros químicos determinados para a linha de água G_{a/b} – Vala mar de Cães.

Testes Químicos	Resultado (a)	Resultado (b)
Oxigénio disponível	14,48 mg/L O ₂	13,03 mg/L O ₂
Salinidade	0,4 ppt	1,9 ppt
pH	7,336	8,279
Turvação	31,9 NTU	30,1 NTU
Temperatura	14,5°C	15,1°C

Os resultados dos parâmetros químicos, apresentados na tabela 17, indicam que esta linha de água está dentro dos padrões químicos normais. Os parâmetros que sofreram alterações significativas foram o pH e a salinidade, comparando os resultados obtidos em (a) e (b). A variação dos valores de salinidade pode ser explicada devido à maior proximidade com o delta do estuário do Rio Tejo. No caso do pH, a alteração pode ser devida à lixiviação dos solos, pois esta é uma zona de agricultura e criação de gado intensa, o que pressupõe o uso de químicos com elevada regularidade, como fungicidas, herbicidas, entre outros.

Esta constatação pode então ser relacionada com os testes microbiológicos, o que nos auxilia na comprovação de que as estirpes bacterianas aqui encontradas poderão, de facto, ser diferentes das restantes encontradas noutras linhas de água. Pois, tal como referido por Guan e colaboradores (2001), no qual estudaram o impacto de alguns pesticidas em bactérias patogénicas, algumas espíres bacterianas como *E. coli* O157:H7, poderão sobreviver e reproduzir-se em meios que contenham algumas variedades de pesticidas.

Discussão final

das as linhas de água

A figura 14 mostra os valores das contagens de UFC's de Coliformes totais, obtidos para todos os locais de amostragem. Estes valores foram logaritmizados para proporcionar uma melhor leitura do gráfico.

A análise da figura 14, permite verificar grandes discrepâncias entre linhas de águas cujas fontes possíveis de poluição fecal variam, mantendo-se semelhantes quando estas fontes são semelhantes. Assim, mantêm-se aproximadamente iguais as linhas de água pertencentes a estações de tratamento privado de águas (B, C), as que são influenciadas maioritariamente por fontes rurais e agrícolas (D, F_a), as que são influenciadas por descargas industriais e urbanas (E_b, F_b) e aquelas cuja fonte é a agricultura intensa (G_a, G_b). As linhas de água como E_a e A apresentam possíveis fontes de poluição distintas das demais. Deste modo, E_a é influenciada grande parte por zonas urbanizadas, e a A apresenta possivelmente todas as fontes de poluição, denotando-se então essas diferenças entre as restantes.

Para a constatação acima apresentada foi necessário recorrer à análise estatística. Assim, foi realizado um teste ANOVA, de modo a verificar se existiam divergências significativas entre as médias das amostras, e seguidamente realizaram-se testes Tukey para indicar se existiam ou não diferenças entre os grupos de amostras ditas semelhantes. Os cálculos estatísticos foram apresentados nas tabelas 18 e 19.

Tabela 18. Tabela de cálculo da ANOVA, apresentando o SQ, gl, MQ, F_{calc} , valor de P e $F_{0,05;9;41}$ crítico. Sendo $H_0: \mu_1=\mu_2=\mu_3=\dots$ e H_1 : existe alguma diferença entre essas médias.

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F_{calc}	Valor P	$F_{0,05;9;41}$
Entre grupos	4,94E+16	9	5,49E+15	2,376916	0,028793	2,117797
Dentro de grupos	9,47E+16	41	2,31E+15			
Total	1,44E+17	50				

Tabela 19. Tabela de cálculo do teste de Tukey, apresentando o EP, o q_{calc} e $q_{0,05;10;41}$. Sendo que, se os valores de q_{calc} para cada par de médias for maior que $q_{0,05;10;41}$, então os grupos diferem entre si.

Grupos escolhidos	EP (erro padrão)	q_{calc}	$q_{0,05;10;41}$
B-C	19624649,84	3,92024E-05	4,73
D-F _a	20582506,39	0,000211017	4,73
E _b -F _b	20582506,39	1,744896006	4,73
G _a -G _b	24035189,24	0,000138141	4,73

A análise da tabela 16 permite constatar que o F_{calc} é superior ao $F_{0,05;9;41}$, de modo que se comprova que existem diferenças entre as médias das amostras apresentadas na figura 12. Assim, recorreu-se ao teste Tukey e, como se verifica na tabela 19, as médias das linhas de água existentes dentro dos grupos (B-C; D-F_a; E_b-F_b; G_a-G_b) anteriormente descritas não variam significativamente, pois todos os q_{calc} são inferiores ao valor de $q_{0,05;10;41}$. Deste modo, podemos afirmar que as linhas de água B-C, D-F_a, E_b-F_b, e G_a-G_b são semelhantes, segundo as análises feitas durante o período de teste.

É importante demonstrar que em todas as linhas de água, das que se estudaram que apresentavam pontos de amostragem no início e no fim (A-D; E_a-E_b; F_a-F_b), houve um aumento nos valores de Coliformes totais, excepto a linha de água G_{a/b} cujos valores diminuíram.

Segundo Roslev e colaboradores (2008), que estudaram a relação de indicadores fecais no sedimento e em águas de recreio, indicadores fecais como *E. coli* e Enterococos têm demonstrado sobreviver melhor nos sedimentos do que na água. Deste modo, a diminuição verificada na linha de água G_{a/b} pode ser devida à água existente na vala ser destinada à rega dos campos, ficando as bactérias retidas nos solos das Lezírias constituindo um local de depósito de bactérias.

Tipagem molecular

Durante a fase de monitorização das linhas de água foram isoladas colónias presumivelmente de *E. coli*, conservadas em glicerol e armazenadas a -80°C . Neste estudo foram analisados 350 isolados, de um total de 10 locais de amostragem. Posteriormente, procedeu-se à tipagem molecular destes isolados utilizando a técnica REP-PCR. Os produtos da reacção de PCR foram analisados por electroforese, revelando os perfis de bandas característicos de cada isolado. Por fim, realizaram-se 14 géis de Agarose, estando os perfis de bandas dos isolados exemplificados na figura 15.

Na tabela 20 podemos verificar que não houve um controlo do número de isolados obtidos por zona de amostragem, tendo-se obtido um número variável de colónias de *E. coli* por linha de água.

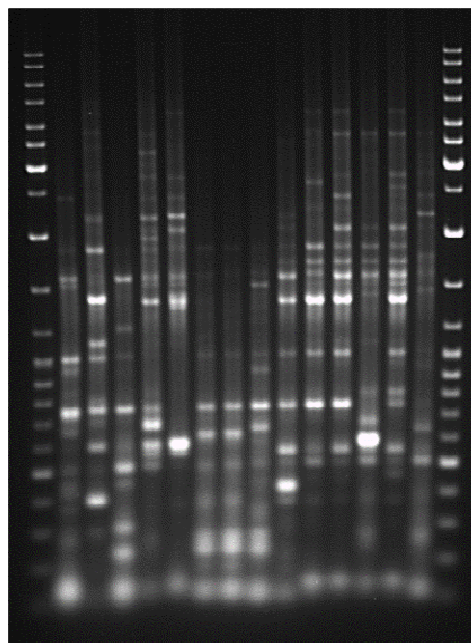


Figura 15. Imagem de perfis de bandas resultados da REP-PCR analisados durante o trabalho.

Tabela 20. Tabela representativa do número de isolados obtidos por zona de amostragem.

Zona de amostragem	Nº de isolados
A	39
B	80
C	17
D	45
E _a	47
E _b	16
F _a	38
F _b	42
G _a	8
G _b	18
Total	350

De modo a analisar os dendrogramas e eliminar os erros associados à técnica de REP-PCR procedemos à análise dos controlos positivos. Os controlos positivos são dois isolados escolhidos aleatoriamente, o G_a2 (que passou a ser designado de P2) e o G_a6 (que passou a ser designado de P6), que estão presentes em todas as reacções de PCR, com o objectivo de verificar se a reacção correu como o esperado.

Através da análise da figura 16, verificamos que existe uma diferença de 28% para os controlos positivos P2 e de 25% para os P6. Tendo em conta que todos os P2 são sempre o isolado G_a2 e todos os P6 o isolado G_a6, os controlos positivos P2 deveriam ter uma similaridade de 100% entre si, bem como os controlos positivos P6, o que não se verifica. Deste modo, podemos referir que existem erros associados ao método,

Como referido por Foley e colaboradores (2009), os erros associados ao método Rep-PCR estão associados com a reprodutibilidade do mesmo. Pois, como os isolados não podem ser todos analisados em simultâneo, a acumulação de erros como na elaboração de géis de electroforese, na temperatura à qual correm os géis, e mesmo nas micro-variações a nível das temperaturas durante a reacção de PCR no termociclador, podem influenciar os resultados finais. Desta forma, e para que possamos analisar os dendrogramas equitativamente, decidi-se considerar que apenas isolados com uma similaridade inferior a 72% representam, com um grau de certeza elevado, estirpes diferentes. A zona de corte a 72% foi determinada tendo em conta a diferença de 28% existente entre os controlos positivos P2.

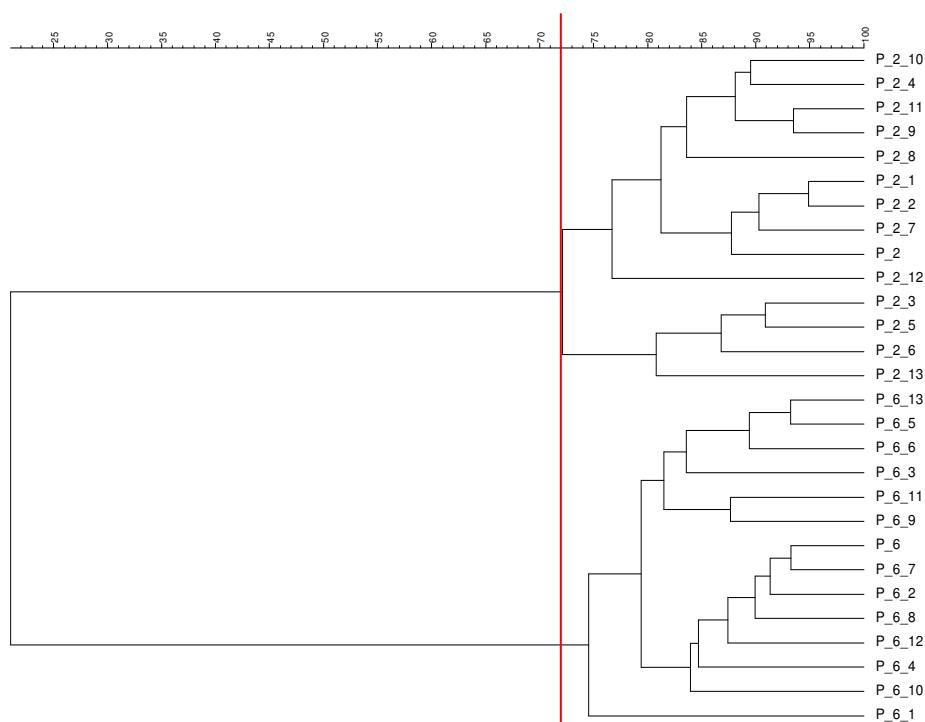


Figura 16. Dendrograma de similaridade dos controlos positivos P2 e P6 presentes nos 14 géis, analisado pelo coeficiente de Pearson com uma tolerância de 1% e optimização de 1,60%. O traço a vermelho corresponde a um corte a 72% de similaridade.

Análise individual dos dendrogramas

Após a análise dos dendrogramas individuais¹ de cada zona de amostragem, e tendo em conta a zona de corte a 72% de similaridade, elaborou-se a seguinte tabela:

Tabela 21. Tabela da análise dos dendrogramas individuais de cada zona de amostragem, em relação ao número de genótipos encontrados de entre os isolados de cada local.

Zona de amostragem	Nº de isolados	Nº de genótipos a 72%
A	39	21
B	80	31
C	17	9
D	45	25
E_a	47	16
E_b	16	11
F_a	38	13
F_b	42	21
G_a	8	6
G_b	18	13
Total	350	166

Pela análise representada na tabela 21, avaliamos que todas as linhas de água apresentam uma elevada variabilidade intra-específica de *Escherichia coli*. Partindo do pressuposto que a existência de *E. coli* nas águas é devida a contaminação fecal, podemos afirmar que existem uma ou várias fontes de contaminação nos locais de amostragem seleccionados.

Devido à ausência de uma base-de-dados relativa às possíveis contaminações fecais no concelho de Vila Franca de Xira, é-nos impossível referir qual ou quais as fontes de contaminação presentes. Podemos, contudo, referir que através da análise dos dendrogramas individuais, existem em todos os locais de amostragem, estirpes e conjunto de estirpes, muito distantes genotipicamente.

Verificamos também que, dependendo do esforço de amostragem realizado para cada zona, o número médio de novos genótipos diminui com o aumento do número de isolados obtidos. Assim, quanto maior for o esforço de amostragem maior será o número de estirpes semelhantes e mais robusta será a análise. Nesse caso, o dendrograma que se irá obter poderá demonstrar grupos melhor definidos, que poderão ser mais representativos de um ou vários tipos de contaminação fecal.

Como se pode observar pela análise do dendrograma da zona de amostragem B (Anexo IV), que apresenta 80 isolados, existem grupos bem definidos que poderão caracterizar tipos específicos de contaminação fecal.

¹ Os dendrogramas individuais encontram-se no Anexo IV

Análise do “input” de contaminação nas zonas de amostragem D-A-E_a-E_b-F_a-F_b-G_a-G_b

Durante o planeamento de amostragem seleccionaram-se quatro linhas de água com duas colheitas cada, uma no início da linha de água (a) e outra no fim (b). O objectivo é verificar se existe “input” de contaminação entre o local de amostragem (a) e o local de amostragem (b). Esse “input”, a existir, será observado pelas diferenças nas comunidades intra-específicas dos isolados de *E. coli* entre o local (a) e (b).

D – Rio Grande da Pipa (início) + A – Vala do Carregado (fim)

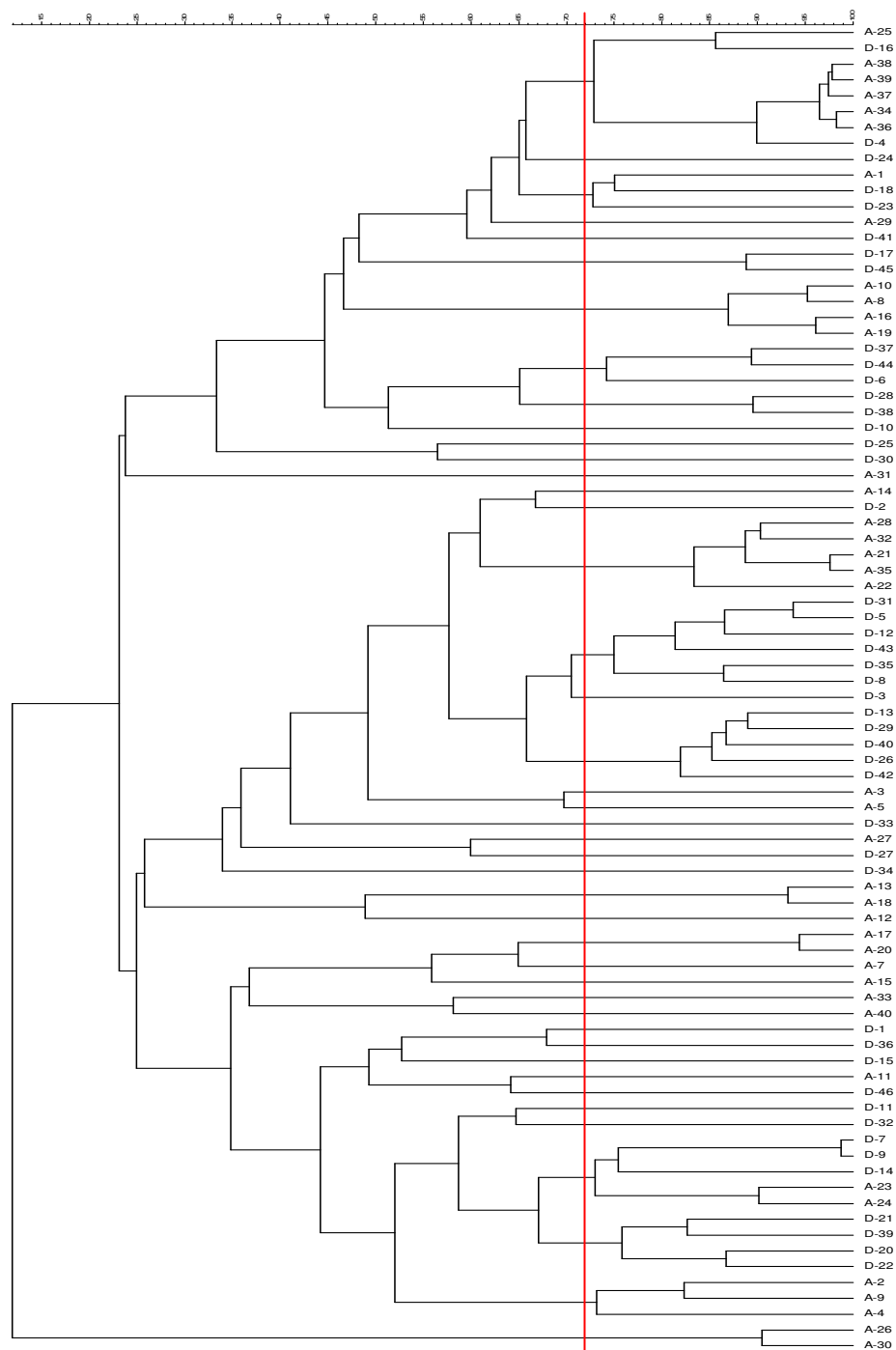


Figura 17. Dendrograma de similaridade dos isolados de D e A, analisado pelo método de correlação de Pearson com uma tolerância de 1% e optimização de 1,60%. A linha a vermelho é a zona de corte a 72%.

Da análise do dendrograma presente na figura 17, verificamos que ao compararmos os isolados das duas linhas de água obtemos, com 72% de similaridade, 43 genótipos distintos. Pela observação da tabela 22, apuramos que existiam 21 genótipos na zona A(b) e 25 na zona D(a). Quando comparamos as comunidades intra-específicas existentes na zona D(a) com as da zona A(b), apenas obtemos 3 genótipos com 72% de similaridade. Desta forma, provavelmente existirá um ou vários “input” de contaminação fecal entre a zona de amostragem D(a) e A(b).

Devido às várias influências (agrícolas, rurais e urbanas) conhecidas nestas duas linhas de água é difícil de localizar a/as fontes de poluição aqui presente. Como referido em “Materiais e Métodos”, a linha de água D é influenciada supostamente por zonas rurais e agrícolas e a linha A por zonas agrícolas, rurais e urbanos, contudo, somente pela análise do dendrograma não é possível associar grupos específicos de isolados a cada tipo de poluição.

Ea – Rib^a da Alfarrobeira + Eb – Rib^a da Verdelha

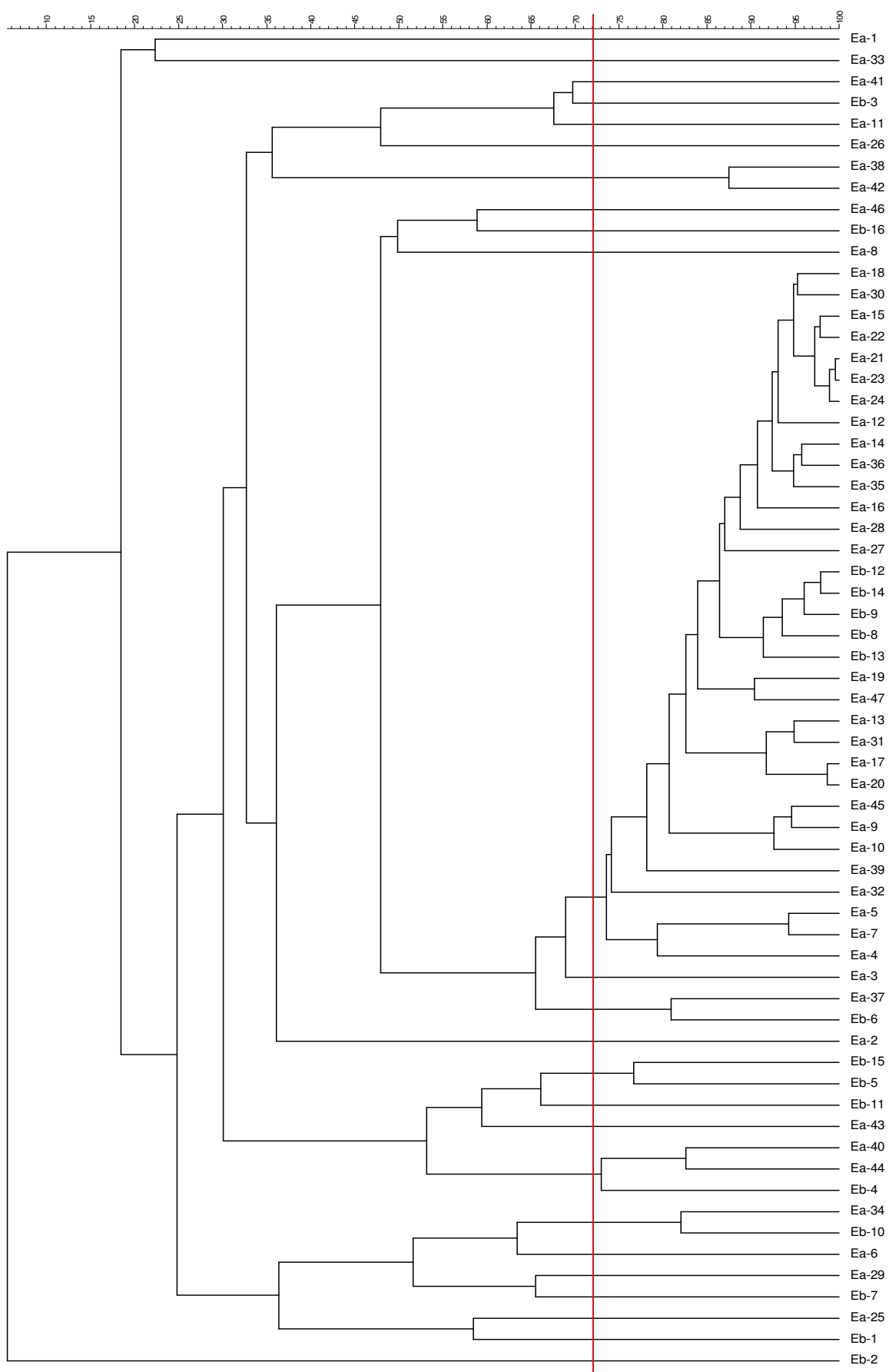


Figura 18. Dendrograma de similaridade dos isolados de Ea e Eb, analisado pelo método de correlação de Pearson com uma tolerância de 1% e optimização de 1,60%. A linha a vermelho é a zona de corte a 72%.

Na análise do dendrograma da linha de água E existente na figura 18, verifica-se que existem 25 genótipos distintos. Pela tabela 22, a zona E(a) apresenta 16 genótipos e a zona E(b) 11 genótipos. Assim, podemos referir que da união das análises da zona E(a) e E(b), somente 2 genótipos apresentam 72% de similaridade. Este facto pode ser devido à existência e um ou vários “input” de contaminação orgânica entre a zona (a) e (b). Com o conhecimento de que existe uma indústria entre o local (a) e (b), possivelmente esta será a responsável pelo “input” de contaminação. Contudo, devido ao elevado número de grupos formados, e só com base no dendrograma dos isolados é impossível afirmar a origem dos novos genótipos encontrados em (b).

F – Riacho do Estaleiro (a +b)

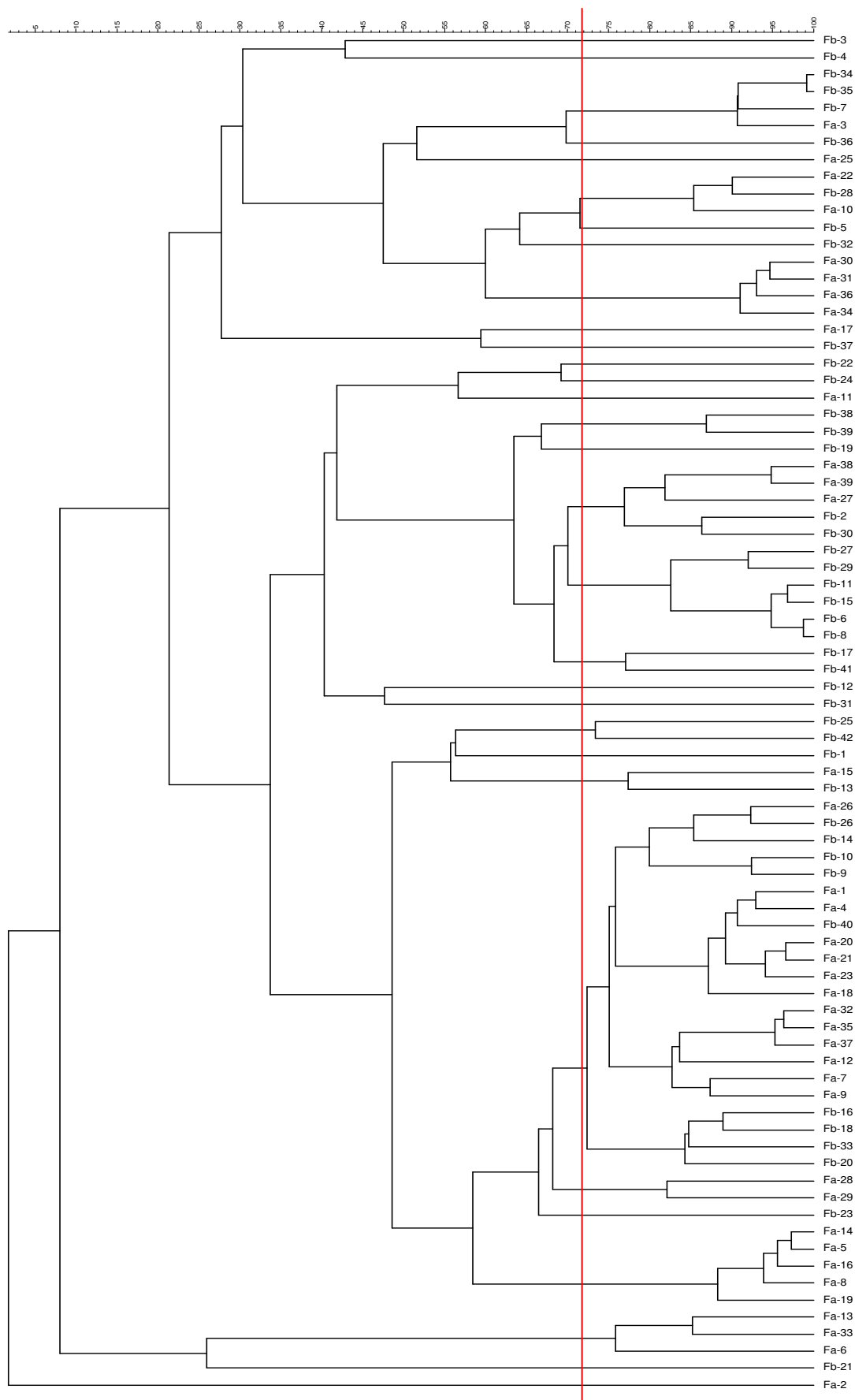


Figura 19. Dendrograma de similaridade dos isolados de Fa e Fb, analisado pelo método de correlação de Pearson com uma tolerância de 1% e otimização de 1,60%. A linha a vermelho é a zona de corte a 72%.

Comparando os isolados obtidos na linha de água F na zona (a) e (b) (figura 19), constatamos que, segundo a análise de correlação de Pearson e com zona de corte de similaridade a 72%, existem 31 genótipos distintos. Da observação da tabela 22, a zona (a) apresenta 13 genótipos e a zona (b) 21. Tendo em conta que da análise conjunta das duas zonas de amostragem existem 31 genótipos, verificamos que apenas 3 genótipos são iguais, o que supõe que houve “input” de contaminação fecal entre o local (a) e (b).

G – Vala mar de Cães (a + b)

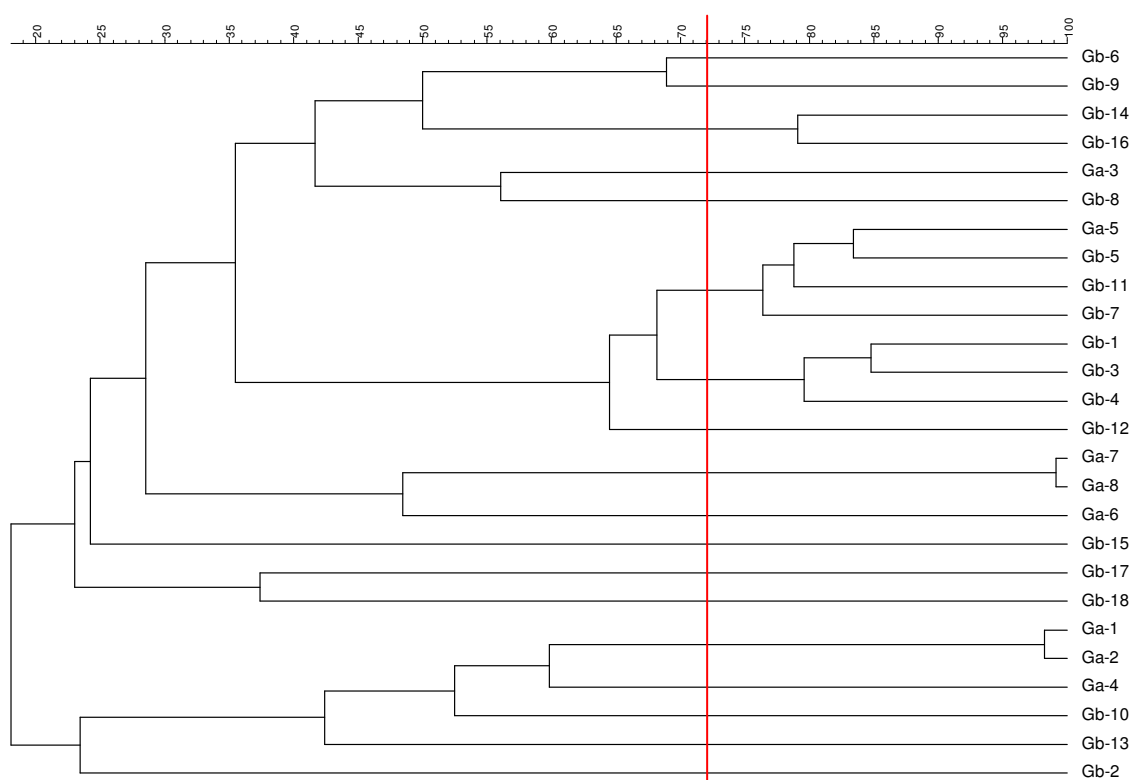


Figura 20. Dendrograma de similaridade dos isolados de Ga e Gb, analisado pelo método de correlação de Pearson com uma tolerância de 1% e otimização de 1,60%. A linha a vermelho é a zona de corte a 72%.

Pela análise do dendrograma presente na figura 20, verificamos que existe uma diversidade de 18 genótipos distintos. Quando comparada com a diversidade existente na zona (a) 6 e na zona (b) 13, constatamos que somente 1 genótipo se mantém constante. Podemos desta forma referir que a comunidade existente na zona (a) é diferente da zona (b), deduzindo a existência de “input” de contaminação. Contudo, neste caso, o número de isolados é baixo tanto na zona (a) como na zona (b), o que pode ter influenciado o resultado. Outra influência

que poderá estar presente é a contaminação química, como pesticidas. Como já foi referido, esta é uma zona de agricultura intensa, o que poderá ser um factor selectivo para as estirpes encontradas na zona (b). Visto que a zona (a) se encontra no início, as estirpes aí encontradas não têm menor contacto com esse tipo de contaminação, podendo ser eliminadas antes de chegar à zona (b).

Análise final

Todos os perfis de tipagem obtidos foram analisados e incluídos num único dendrograma. Este dendrograma serviu como base para a formulação da tabela presente no anexo V, na qual, usando o índice de similaridade de Pearson e com um corte a 72%, dos 350 isolados distinguiram-se 123 genótipos distintos. Quando analisamos a tabela 21, constatamos que, do somatório dos genótipos encontrados em cada linha de água, obtemos 166 genótipos distintos. Assim, verificamos que existem 43 genótipos que, de entre linhas de água distintas, são iguais.

A análise permitiu verificar que isolados com perfis de tipagem similares (>72%) ocorrem em mais do que duas zonas de amostragem, e algumas mais que uma vez, como é o caso da estirpe St80 que aparece 74 vezes em 8 locais. Esta informação pode sugerir que a estirpe St80 se encontra presente em qualquer tipo de contaminação ou que, nos 8 locais estudados, existe pelo menos o tipo de contaminação representado por esta estirpe.

A similaridade entre comunidades de *E. coli* dos diferentes locais foi avaliada através da construção de uma matriz de presença /ausência de isolados com perfis de tipagem similares (>72%). Com base no índice de

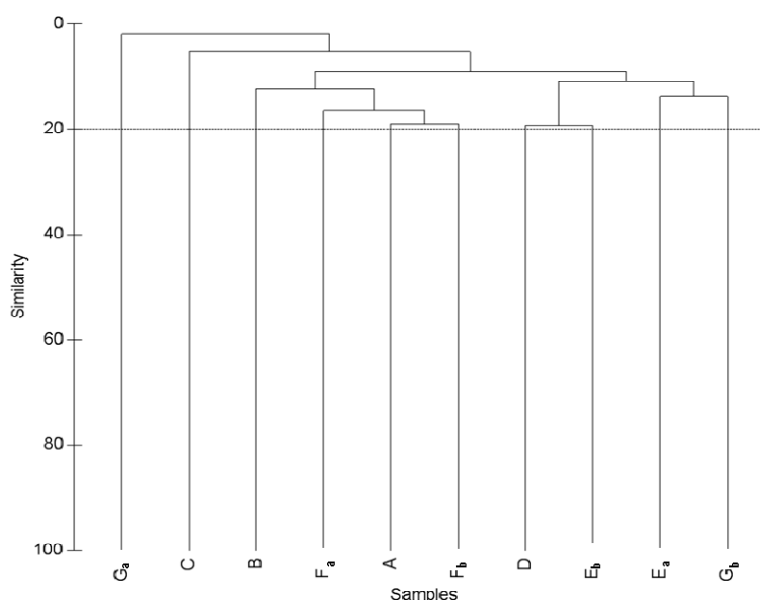


Figura 21. Dendrograma que diferencia as zonas de amostragem mediante as similaridades existentes entre as comunidades intra-específicas de *E. coli*. A linha de corte a 20% de similaridade. Análise segundo o método de Jaccard.

similaridade de Jaccard construiu-se uma matriz de similaridades e com base nesta construiu-se o dendrograma apresentado na figura 20. A análise foi efectuada usando o programa PRIMER 6 (PRIMER-E Ltd, Ivybridge, UK).

Através da análise da figura 21, verificamos que a linha de água G_a apresenta uma comunidade muito específica, totalmente diferente das restantes. Contudo, o reduzido número de isolados recolhidos poderá ter influenciado o resultado, não abrangendo o total da diversidade realmente presente nesta zona de amostragem.

Comparando a linha de água C na figura 21, que é uma descarga directa de uma fábrica de produtos alimentares, com a análise do dendrograma presente no Anexo VI, constatamos que esta apresenta grupos de isolados distintos dos isolados das restantes zonas de amostragem, inferindo que possivelmente as estirpes aqui colhidas poderão ser características de algum tipo de contaminação. Sabendo que esta linha de água é uma descarga de uma fábrica, estas estirpes podem ser características deste tipo de poluição. Contudo, mais uma vez esta linha de água apresenta poucos isolados, o que poderá ter influenciado o resultado final.

De acordo com Ng e colaboradores (2005), que estudaram os efeitos de diversos pesticidas na sobrevivência de algumas bactérias patogénicas como *E. coli* e *Salmonella*, estas poderão sobreviver e crescer em determinadas preparações de pesticidas comerciais. Indicando que os isolados obtidos na linha de água G (linha de água das Lezírias) poderão ser característicos deste tipo de locais. Esta pode ser uma das razões para o facto da zona de amostragem G_a ser tão distinta das restantes.

Este dendrograma também nos evidencia a diversidade das comunidades existentes dentro das amostras recolhidas no início e no fim das linhas de água D-A, E_a-E_b, F_a-F_b, G_a-G_b, comprovando os resultados comentados no capítulo anterior, que as comunidades existentes no início são distintas das do fim, propondo a existência de “input” de contaminação fecal.

Da análise retiramos que, independentemente das comunidades de *Escherichia coli* nas zonas de amostragem apresentarem divergências, existe alguma similaridade entre estas. Esta similaridade pode ser devida à presença de um ou vários tipos de poluição semelhante. Se compararmos os tipos de poluição que supostamente existem em A (urbana, rural e agrícola), F_a (urbana e agrícola) e F_b (Urbana), está muito presente o factor *Homem*, o que poderá relacionar estas linhas de água.

Podemos ainda referir que, da análise geral da tipagem dos isolados, o número de isolados é um factor importante para obter resultados que apresentem uma elevada robustez. Como se verificou, quando o número de isolados é reduzido as observações das análises não podem ser muito concisas, como no caso das linhas C e G. O contrário acontece quando lidamos com um elevado número de isolados, como é o caso da linha B, onde se observa que o número de novos génotipos tende a estabilizar.

Conclusões

O Rio Tejo é uma ZPE (Zona de Protecção Especial) de elevada importância internacional. No entanto, tem sido considerado bastante prejudicial para a saúde de animais e pessoas que dele dependam, estando classificado como muito poluído de acordo com os estudos efectuados pelo SNIRH (SNIRH, 2010).

No conselho de Vila Franca de Xira existem vários afluentes que desaguam no rio, provenientes de estações de tratamento de indústrias e de águas residuais públicas. O objectivo deste projecto consiste na identificação de linhas de água do concelho que contribuam para o aumento da poluição orgânica do Rio Tejo, e posterior identificação das fontes de contaminação. Para tal, procedeu-se à monitorização da qualidade microbiológica de 7 linhas de água, de acordo com o Decreto-lei 236/98 e à tipagem dos isolados de *Escherichia coli* característicos de cada zona de amostragem.

- De acordo com os objectivos do trabalho, a monitorização da qualidade microbiológica das linhas de água seleccionadas permitiu encontrar pontos críticos que necessitam rapidamente de um esforço comunitário para que o seu impacto no meio envolvente, social e ambiental, e em particular no Rio Tejo, seja diminuído.
- Os resultados obtidos neste trabalho permitem-nos afirmar que algumas das linhas de água seleccionadas apresentam níveis de poluição fecal elevadíssimos, como as linhas de água E (Rib^a da Verdelha) e F (Riacho do Estaleiro), estando as restantes num estado razoável (atendendo à classificação do SNIRH).
- Pelo que se pode verificar através dos resultados apresentados, a acumulação de carga bacteriana ao longo das linhas de água é um factor a ser considerado.
- A tipagem molecular dos isolados, utilizando a técnica REP-PCR, permitiu verificar uma elevada variabilidade intra-específica da espécie *Escherichia coli*, o que impediu a formulação de respostas quanto à origem da contaminação orgânica presente nas linhas de água seleccionadas. Contudo, podemos sugerir que esta é uma boa metodologia para analisar a plasticidade genómica de uma espécie bacteriana como *E. coli*.

Variabilidade em Escherichia coli de águas poluídas de Vila Franca de Xira

- O número de isolados recolhidos foi um ponto crítico, pois esta é uma metodologia que exige um elevado número de isolados de cada ponto de amostragem para que os resultados apresentados sejam robustos.

- Esta metodologia permitiu também, identificar “input” de contaminação, observado pela variação das comunidades dentro da mesma linha de água de um ponto (a) início e um ponto (b) fim.

Considerações finais

Tendo em conta as dificuldades encontradas no decorrer deste projecto, podemos sugerir algumas alterações de modo a que a resposta sobre as origens das fontes de poluição possa ser dada através do método REP-PCR para *Microbial Source Tracking*:

- Aumento do esforço de amostragem, recolhendo o número mínimo de isolados que permitam uma caracterização geral das comunidades presentes em cada local de recolha;
- Identificação de todas as possíveis fontes de contaminação de cada zona de amostragem, e subsequente recolha de isolados característicos de cada fonte de modo a criar uma base-de-dados;
- Uniformização na elaboração dos géis de Agarose, na temperatura à qual estes correm, e no tempo de coloração em brometo de etídio.

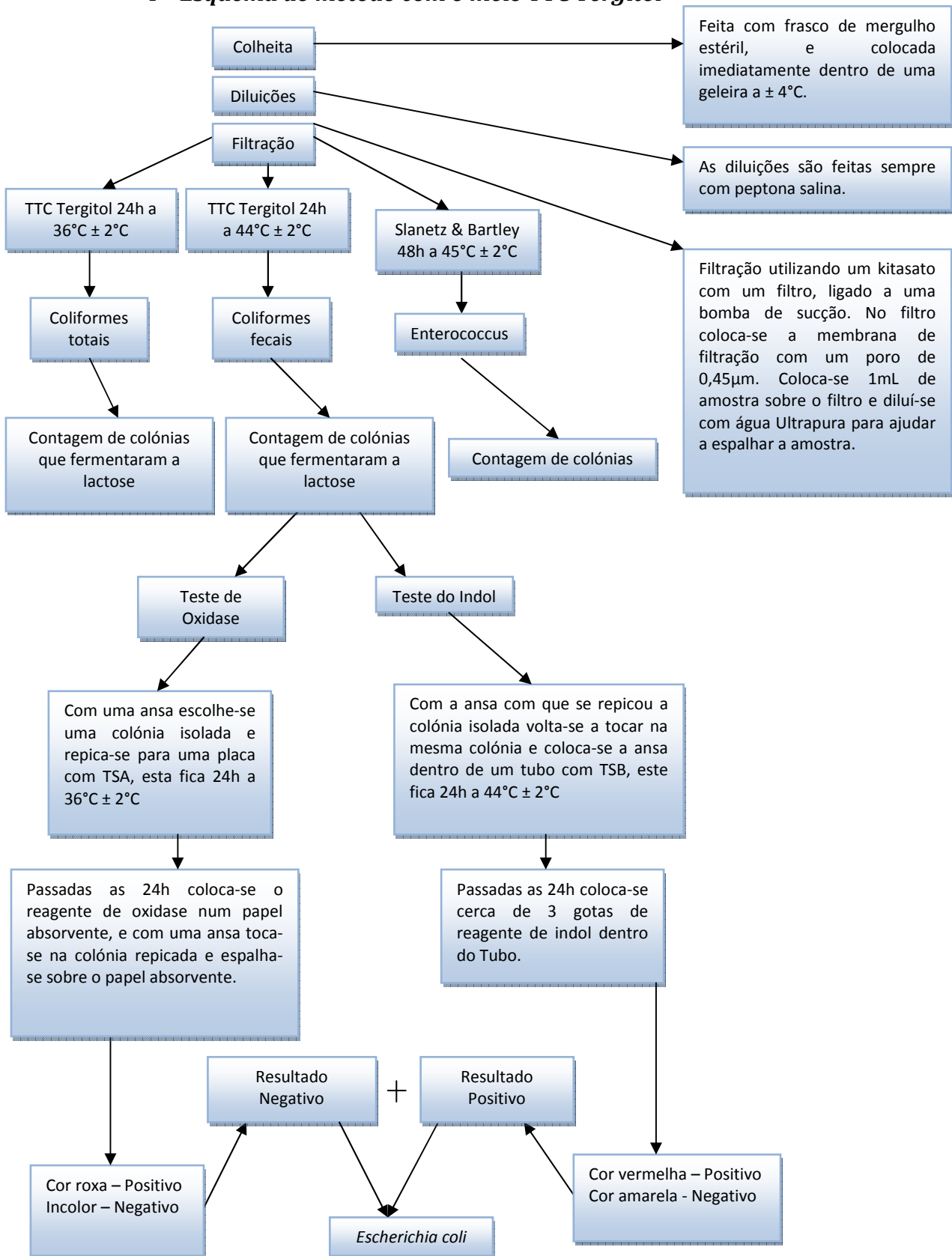
Referências Bibliográficas

- Anderson, M. A., Whitlock, J. E., & Harwood, V. J. (2006). Diversity and distribution of *Escherichia coli* genotypes and antibiotic resistance phenotypes in feces of humans, cattle, and horses. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 6914-6922.
- Baião, C., & Boavida, M. (2005). Rotifers of Portuguese reservoirs in river Tejo catchment: Relations with trophic state. *Limnetica*, 24(21-22); 103-114.
- Baldy-Chudzik, K., Niedbach, J., & Stosik, M. (2003). Rep-PCR fingerprinting as a tool for the analysis of genomic diversity in *Escherichia coli* strains isolated from an aqueous/freshwater environment. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 8(3), 793-798.
- Brownell, M. J., Harwood, V. J., Kurz, R. C., McQuaig, S. M., Lukasik, J., & Scott, T. M. (2007). Confirmation of putative stormwater impact on water quality at a Florida beach by microbial source tracking methods and structure of indicator organism populations. *Water Research*, 41(16), 3747-3757.
- Byappanahalli, M., Fowler, M., Shively, D., & Whitman, R. (2003). Ubiquity and persistence of *Escherichia coli* in a Midwestern coastal stream. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4549-4555.
- Chou, C. C., Lin, Y. C., & Su, J. J. (2004). Microbial indicators for differentiation of human- and pig-sourced fecal pollution. *Journal of Environmental Science and Health, Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 39(6), 1415-1421.
- Cimenti, M., Hubberstey, A., Bewtra, J. K., & Biswas, N. (2007). Alternative methods in tracking sources of microbial contamination in waters. *Water Sa*, 33(2), 183-194.
- Costa, F., & da Franca, M. (1990). Os Recursos Vivos Marinhos e a Pesca no Estuário do Tejo. *Que Tejo, Que Futuro* (Vol. II, pp. 201-216). Lisboa: Edição da Associação dos Amigos do Tejo.
- Costan-Longares, A., Montemayor, M., Payan, A., Mendez, J., Jofre, J., Mujeriego, R., & Lucena, F. (2008). Microbial indicators and pathogens: Removal, relationships and predictive capabilities in water reclamation facilities. *Water Research*, 42(17), 4439-4448.
- Czajkowska, D., Boszczyk-Maleszak, H., Sikorska, I. R., & Sochaj, A. (2008). Studies on the survival of enterohemorrhagic and environmental *Escherichia coli* strains in wastewater and in activated sludges from dairy sewage treatment plants. *Polish Journal of Microbiology*, 57(2), 165-171.
- Field, K. G., & Samadpour, M. (2007). Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Research*, 41(16), 3517-3538.
- Finney, M., Smullen, J., Foster, H. A., Brokx, S., & Storey, D. M. (2003). Evaluation of Chromocult coliform agar for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae from faecal samples from healthy subjects. *Journal of Microbiological Methods*, 54(3), 353-358.

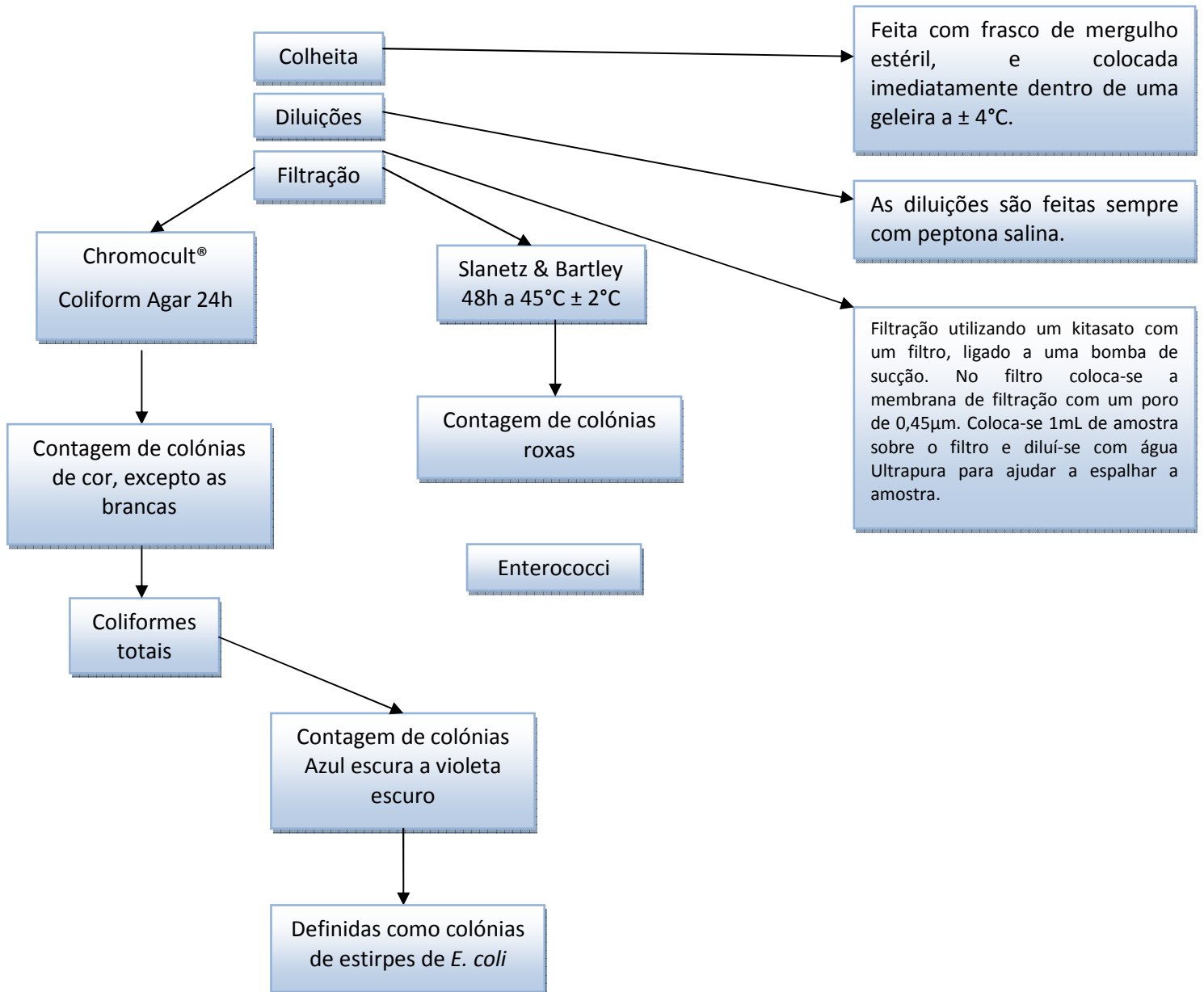
- Foley, S. L., Lynne, A. M., & Nayak, R. (2009). Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infection Genetics and Evolution*, 9(4), 430-440.
- Fresenius, W., Quentin, K. E., & Schneider, W. (1988). *Water analysis : a practical guide to physico-chemical, chemical, and microbiological water examination and quality assurance*. Berlin ; New York: Springer-Verlag.
- Garcia-Armisen, T., & Servais, P. (2007). Respective contributions of point and non-point sources of E-coli and enterococci in a large urbanized watershed (the Seine river, France). *Journal of Environmental Management*, 82(4), 512-518.
- Guan, T. Y., Blank, G., Ismond, A., & Van Acker, R. (2001). Fate of foodborne bacterial pathogens in pesticide products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(5), 503-512.
- Haack, S. K., Duris, J. W., Fogarty, L. R., Kolpin, D. W., Focazio, M. J., Furlong, E. T., & Meyer, M. T. (2009). Comparing Wastewater Chemicals, Indicator Bacteria Concentrations, and Bacterial Pathogen Genes as Fecal Pollution Indicators. *Journal of Environmental Quality*, 38(1), 248-258.
- Hansen, D. L., Ishii, S., Sadowsky, M. J., & Hicks, R. E. (2009). *Escherichia coli* Populations in Great Lakes Waterfowl Exhibit Spatial Stability and Temporal Shifting. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(6), 1546-1551.
- Harwood, V. J., Brownell, M., Wang, S., Lepo, J., Ellender, R. D., Ajidahun, A., Hellein, K. N., Kennedy, E., Ye, X., & Flood, C. (2009). Validation and field testing of library-independent microbial source tracking methods in the Gulf of Mexico. *Water Research*, 43(19), 4812-4819.
- I.N.E. (2007). *População, área, freguesias e densidade populacional*. C.M. Vila Franca de Xira.
- ICN. (1994). Zonas de Protecção especial - Estuário do Tejo. *Plano Sectorial da Rede Natura 2000*, 13.
- Ishii, S., & Sadowsky, M. J. (2009). Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Environmental Microbiology*, 11(4), 733-740.
- Leclerc, H., Mossel, D. A. A., Edberg, S. C., & Struijk, C. B. (2001). Advances in the bacteriology of the Coliform Group: Their suitability as markers of microbial water safety. *Annual Review of Microbiology*, 55, 201-234.
- Lu, Z. X., Lapen, D., Scott, A., Dang, A., & Topp, E. (2005). Identifying host sources of fecal pollution: Diversity of *Escherichia coli* in confined dairy and swine production systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 5992-5998.
- Marques, A. M. (2010). *A pesca da enguia e a valorização sustentável dos recursos do rio Tejo*. Lisboa: Âncora Editora.

- McQuaig, S. M., Scott, T. M., Harwood, V. J., Farrah, S. R., & Lukasik, J. O. (2006). Detection of human-derived fecal pollution in environmental waters by use of a PCR-based human polyomavirus assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7567-7574.
- Meays, C. L., Broersma, K., Nordin, R., & Mazumder, A. (2004). Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. *Journal of Environmental Management*, 73(1), 71-79.
- Mohapatra, B. R., Broersma, K., & Mazumder, A. (2007). Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. *FEMS Microbiology Letters*, 277(1), 98-106.
- Mohapatra, B. R., Broersma, K., Nordin, R., & Mazumder, A. (2007). Evaluation of Repetitive Extragenic Palindromic-PCR for Discrimination of Fecal *Escherichia coli* from Humans, and Different Domestic- and Wild-Animals. *MICROBIOLOGY and IMMUNOLOGY*, 51(8), 733-740.
- Mohapatra, B. R., & Mazumder, A. (2008). Comparative efficacy of five different rep-PCR methods to discriminate *Escherichia coli* populations in aquatic environments. *Water Science and Technology*, 58(3), 537-547.
- Ng, P. J., Fleet, G. H., & Heard, G. M. (2005). Pesticides as a source of microbial contamination of salad vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 101(2), 237-250.
- Nunes, F. O. (1993). *Vieira de Leiria – A História, o Trabalho, a Cultura*. Vieira de Leiria: Edição da Junta de Freguesia de Vieira de Leiria.
- Pitkanen, T., Paakkari, P., Miettinen, I. T., Heinonen-Tanski, H., Paulin, L., & Hanninen, M. L. (2007). Comparison of media for enumeration of coliform bacteria and *Escherichia coli* in non-disinfected water. *Journal of Microbiological Methods*, 68(3), 522-529.
- Portugal. (2005). *Lei n.º 58/2005. Aprova a Lei da Água, transpondo para a ordem jurídica nacional a Directiva n.º 2000/60/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Outubro, e estabelecendo as bases e o quadro institucional para a gestão sustentável das águas*.
- Rompre, A., Servais, P., Baudart, J., de-Roubin, M. R., & Laurent, P. (2002). Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 49(1), 31-54.
- Roslev, P., Bastholm, S., & Iversen, N. (2008). Relationship between fecal indicators in sediment and recreational waters in a Danish estuary. *Water Air and Soil Pollution*, 194(1-4), 13-21.
- Salgot, M., Huertas, E., Weber, S., Dott, W., & Hollender, J. (2006). Wastewater reuse and risk: definition of key objectives. *Desalination*, 187(1-3), 29-40.
- Santo Domingo, J. W., Bambic, D. G., Edge, T. A., & Wuertz, S. (2007). Quo vadis source tracking? Towards a strategic framework for environmental monitoring of fecal pollution. *Water Research*, 41(16), 3539-3552.

- Scott, T. M., Rose, J. B., Jenkins, T. M., Farrah, S. R., & Lukasik, J. (2002). Microbial source tracking: Current methodology and future directions. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 5796-5803.
- Serrano, J. M. (2010). *A Associação da Rota Turística dos Avieiros do Tejo e do Sado*. Lisboa: Âncora Editora.
- Seurinck, S., Verstraete, W., & Siciliano, S. (2005). Microbial Source Tracking for Identification of Fecal Pollution. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 4(1), 19-37.
- Sidhu, J. P. S., & Toze, S. G. (2009). Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature review. *Environment International*, 35(1), 187-201.
- Simpson, J. M., Santo Domingo, J. W., & Reasoner, D. J. (2002). Microbial source tracking: State of the science. *Environmental Science & Technology*, 36(24), 5279-5288.
- SNIRH. (2010). Qualidade da água de Superfície. Acedido a 6 de Janeiro, 2010, de http://snirh.pt/snirh.php?main_id=1&item=4.1.1&objlink=&objrede=
- Soares, J. O., & Coutinho, M. C. (2004). *Estudo da caracterização empresarial do concelho de Vila Franca de Xira*: Instituto Superior Técnico.
- Stewart, J. R., Gast, R. J., Fujioka, R. S., Solo-Gabriele, H. M., Meschke, J. S., Amaral-Zettler, L. A., del Castillo, E., Polz, M. F., Collier, T. K., Strom, M. S., Sinigalliano, C. D., Moeller, P. D. R., & Holland, A. F. (2008). The coastal environment and human health: microbial indicators, pathogens, sentinels and reservoirs. *Environmental Health*, 7.
- Tallon, P., Magajna, B., Lofranco, C., & Leung, K. T. (2005). Microbial indicators of faecal contamination in water: A current perspective. *Water Air and Soil Pollution*, 166(1-4), 139-166.
- Vinten, A. J., Sym, G., Avdic, K., Crawford, C., Duncan, A., & Merrilees, D. W. (2008). Faecal indicator pollution from a dairy farm in Ayrshire, Scotland: source apportionment, risk assessment and potential of mitigation measures. *Water Research*, 42(4-5), 997-1012.
- Wery, N., Lhoutellier, C., Ducray, F., Delgenes, J. P., & Godon, J. J. (2008). Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. *Water Research*, 42(1-2), 53-62.
- Winward, G. P., Avery, L. M., Frazer-Williams, R., Pidou, M., Jeffrey, P., Stephenson, T., & Jefferson, B. (2008). A study of the microbial quality of grey water and an evaluation of treatment technologies for reuse. *Ecological Engineering*, 32(2), 187-197.
- World Health Organization, W. (2001). Indicator of microbial water quality. In L. F. a. J. Bartram (Ed.), *Water Quality: Guidelines, standards and Health* (pp. 289-316). London, UK: IWA Publishing.
- Yates, M. V. (2007). Classical indicators in the 21st century - Far and beyond the coliform. *Water Environment Research*, 79(3), 279-286.

Anexos**• 1 – Esquema do método com o meio TTC Tergitol**

• **II – Esquema do método com o meio Chromocult® Coliform Agar**



- **III – Equações utilizadas**

- Para a avaliação do CQO foi necessário realizar a seguinte operação:

$$CQO = \frac{(Vt_{branco} - Vt_{amostra}) \times 16000 \times (\frac{0,25 \times Vd}{Tp})}{V_{amostra}}$$

- Cálculo do CQO:

V_{t_branco} : volume de titulante gasto na titulação do branco

$V_{t_amostra}$: volume de titulante gasto na titulação da amostra

V_d : Volume gasto de titulante (Dicromato de potássio)

T_p : Volume gato de solução FAS (Sulfato de amónio ferroso)

- ANOVA e Teste Tukey:

- Termo de correcção:

$$C = \frac{(\sum x)^2}{\sum n_i}$$

- Soma dos quadrados total:

$$SQ_{total} = \sum x^2 - C$$

- Soma dos quadrados entre:

$$SQ_{entre} = \sum \left(\frac{\sum x^2}{n_i} \right) - C$$

- Soma dos quadrados residual:

$$SQ_{residual} = SQ_{total} - SQ_{entre}$$

- Graus de Liberdade total:

$$GL_{total} = \sum n_i - 1$$

- Graus de Liberdade entre:

$$GL_{entre} = k - 1$$

- Graus de Liberdade residual:

$$GL_{residual} = GL_{total} - GL_{entre}$$

- Média dos Quadrados entre:

$$MQ_{entre} = \frac{SQ_{entre}}{GL_{entre}}$$

- Média dos Quadrados residual:

$$MQ_{residual} = \frac{SQ_{residual}}{GL_{residual}}$$

- Cálculo do valor de F :

$$F_{calc} = \frac{QM_{entre}}{QM_{residual}}$$

- Erro Padrão:

$$\sqrt{\left(\frac{QM_{residual}}{2}\right) \times \left(\frac{1}{n_{i\ a}} \times \frac{1}{n_{i\ b}}\right)}$$

- Cálculo do valor de q :

$$q_{calc} = \frac{(\bar{x}_a - \bar{x}_b)}{EP}$$

▪ Cálculo da ANOVA e do Teste de Tukey:

χ^2 : somatório das réplicas ao quadrado

n_i : número de réplicas por cada amostra

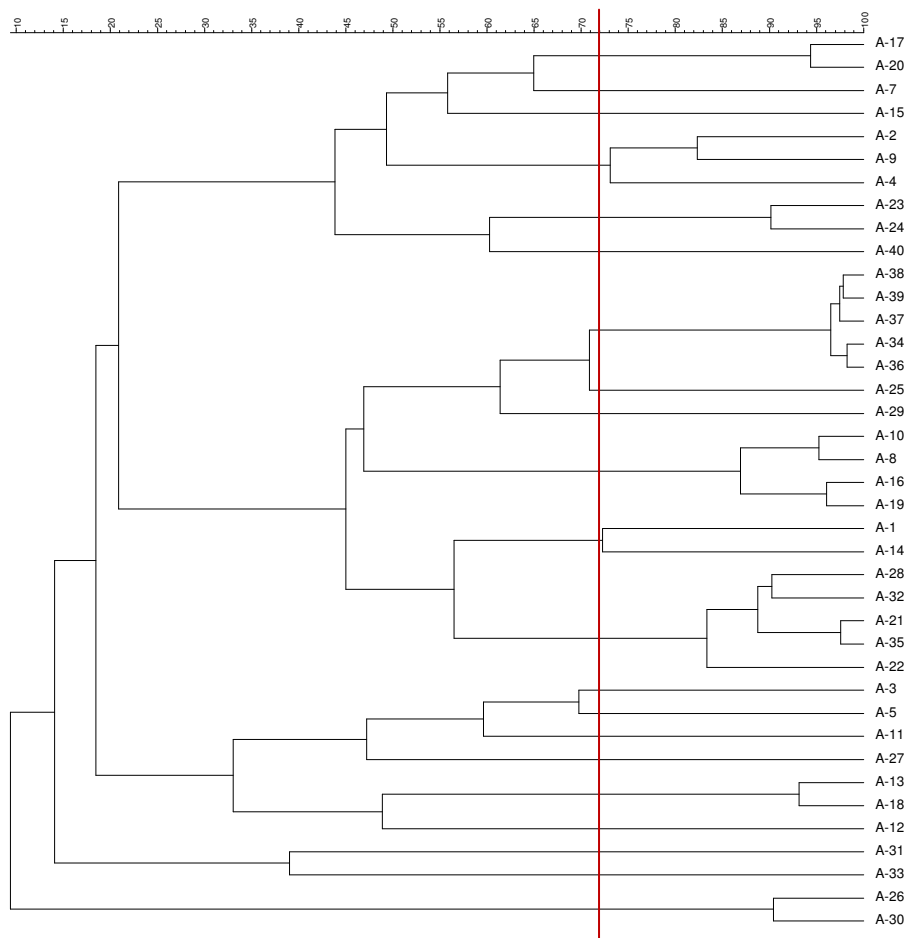
k : número de amostras total

$(\bar{x}_a - \bar{x}_b)$: subtração da média dos valores de A à média dos valores de B

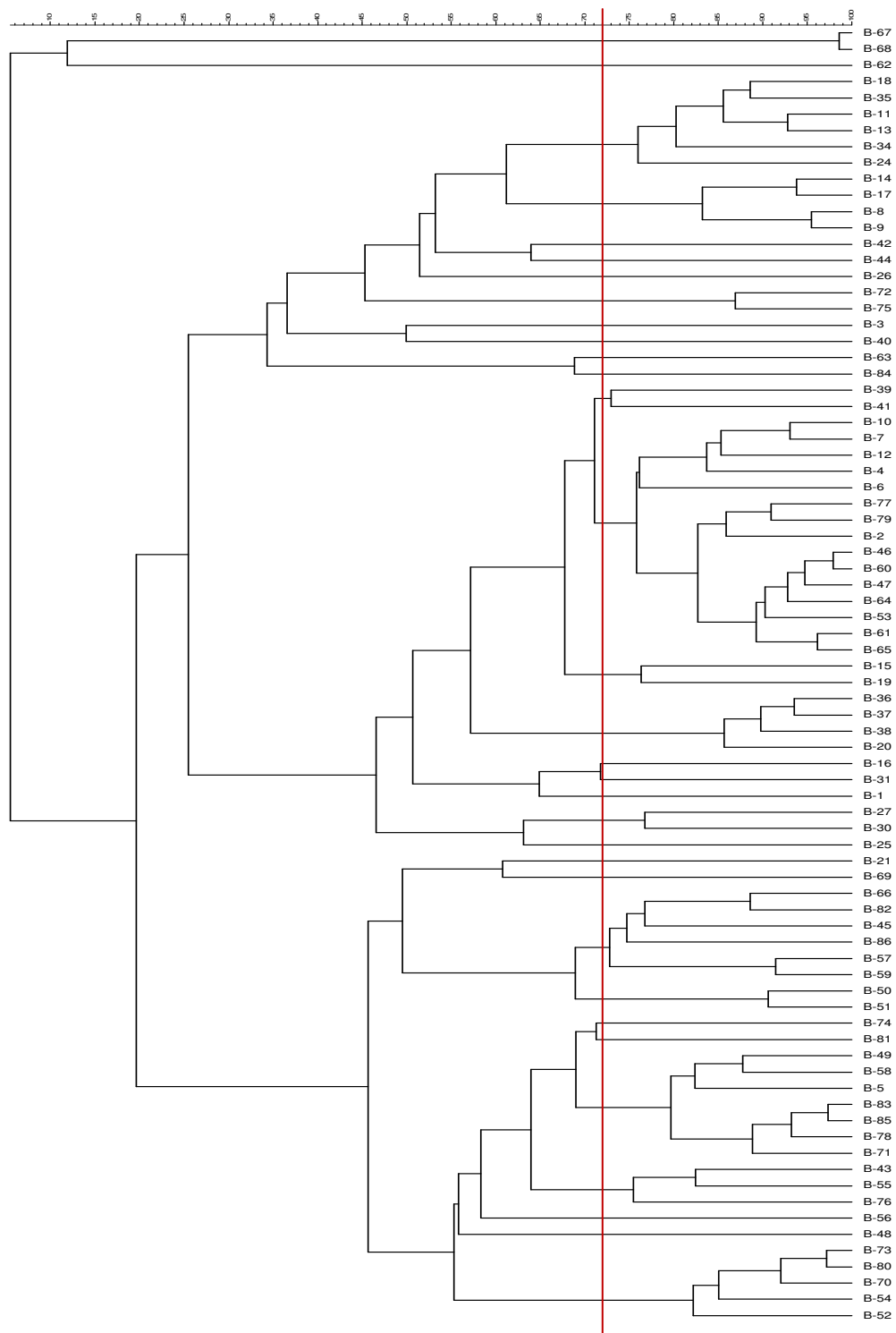
- ***IV – Dendrogramas das Zonas de amostragem***

Dendrogramas de similaridade dos isolados obtidos nas diversas zona de amostragem, analisado pelo método de correlação de Pearson com uma tolerância de 1% e otimização de 1,60%. A linha a vermelho demonstra a zona de corte a 72%, pela se considera a mesma estirpe

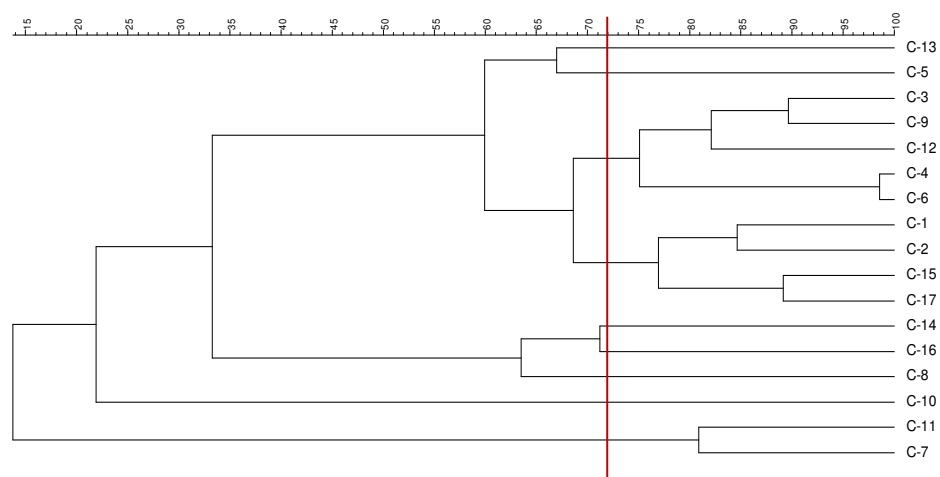
(A) - Vala do Carregado



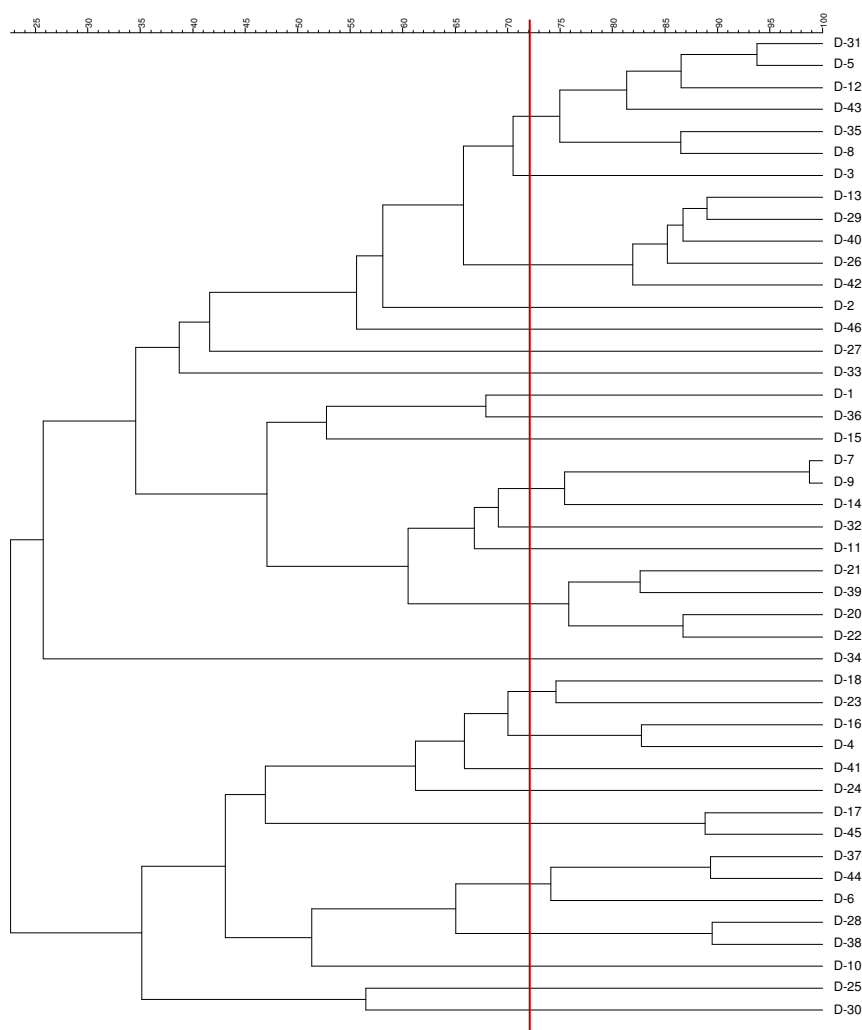
(B) – Vala da Central Eléctrica



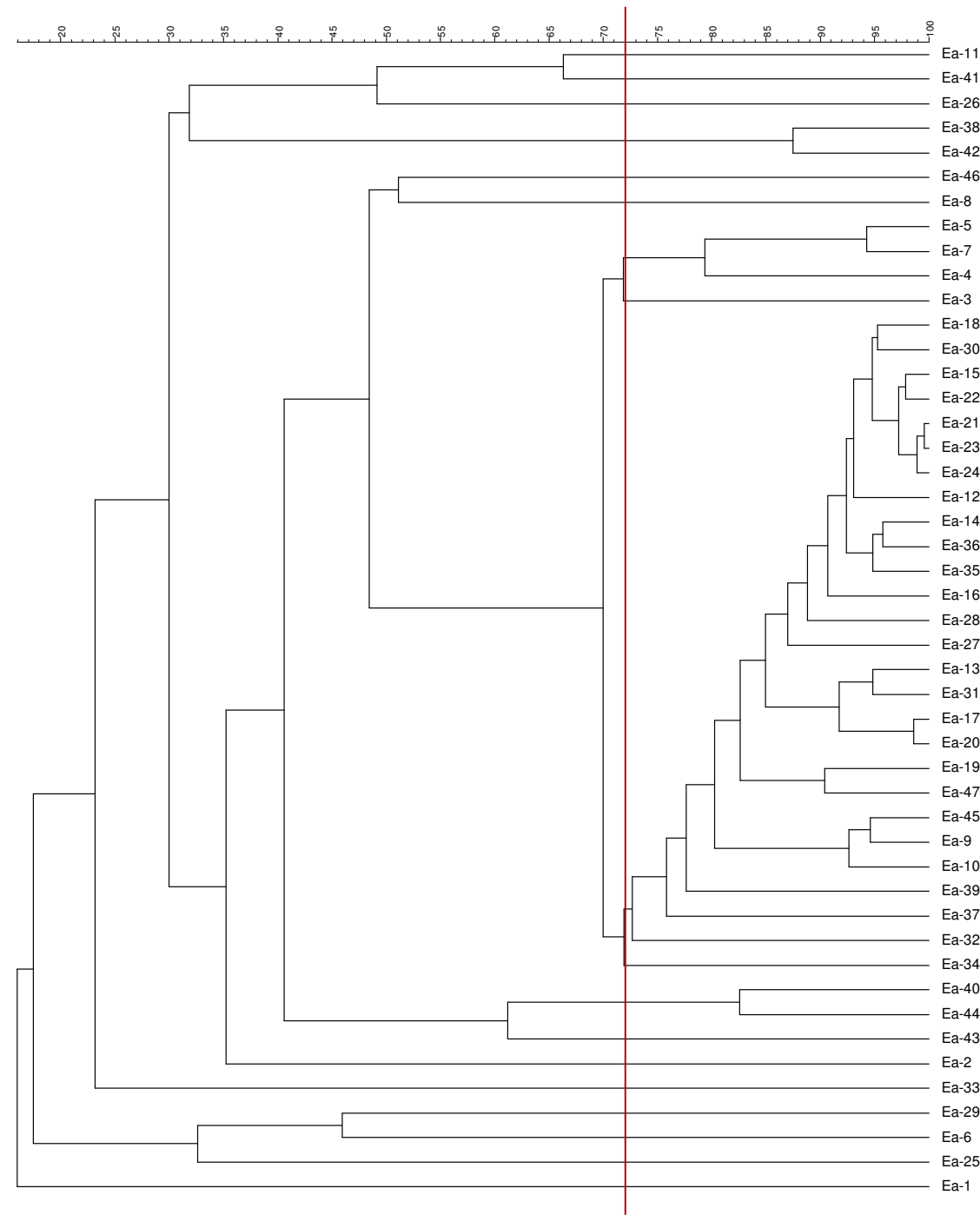
(C) – Descargas da Fábrica de Tomate

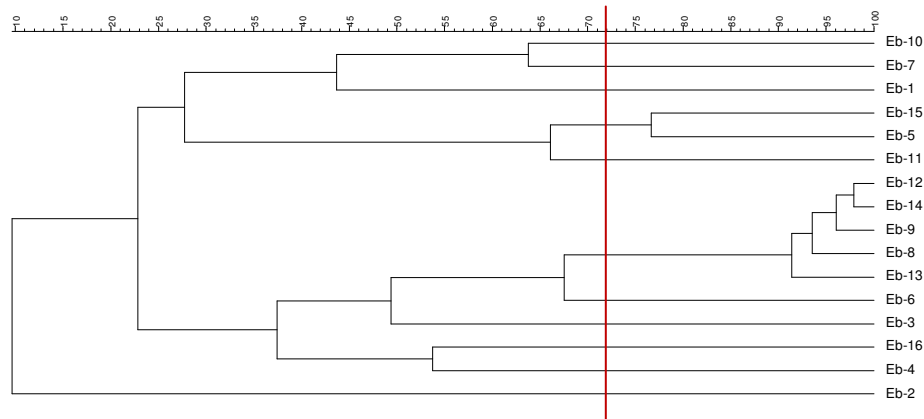
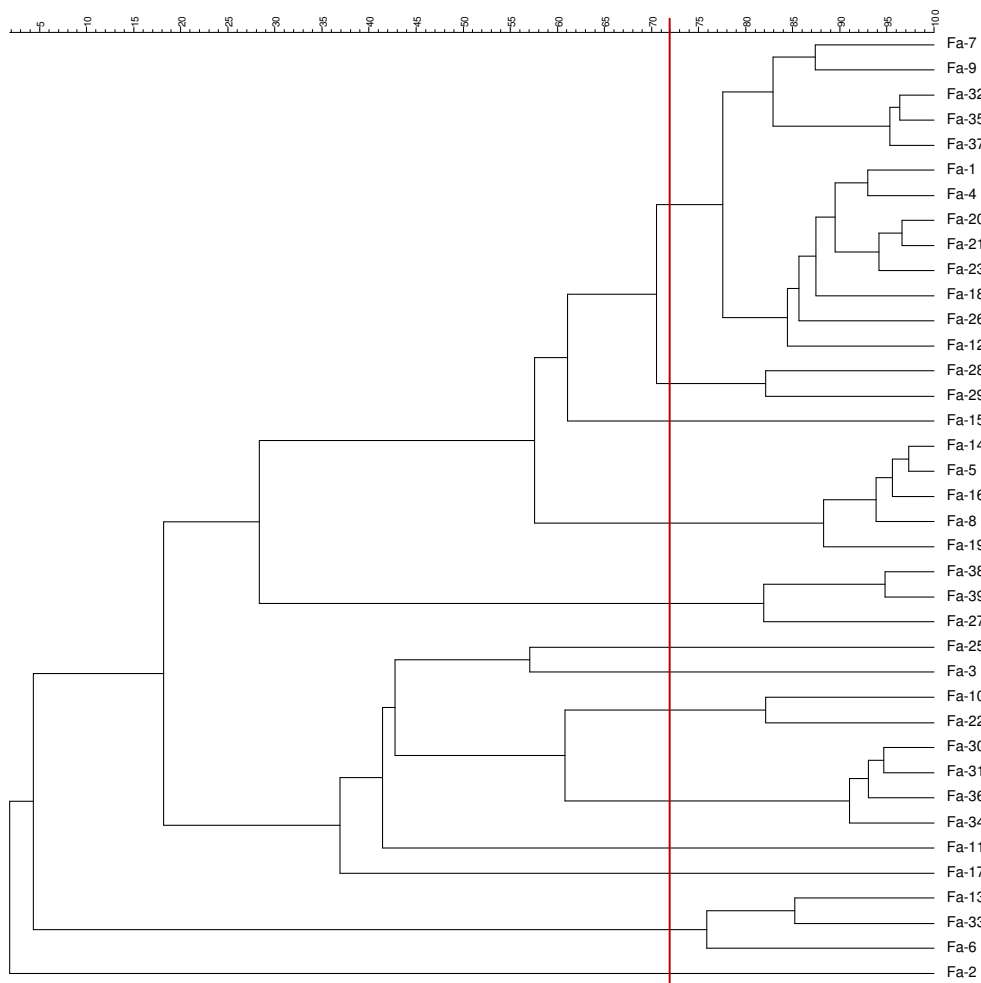


(D) – Rio Grande da Pipa

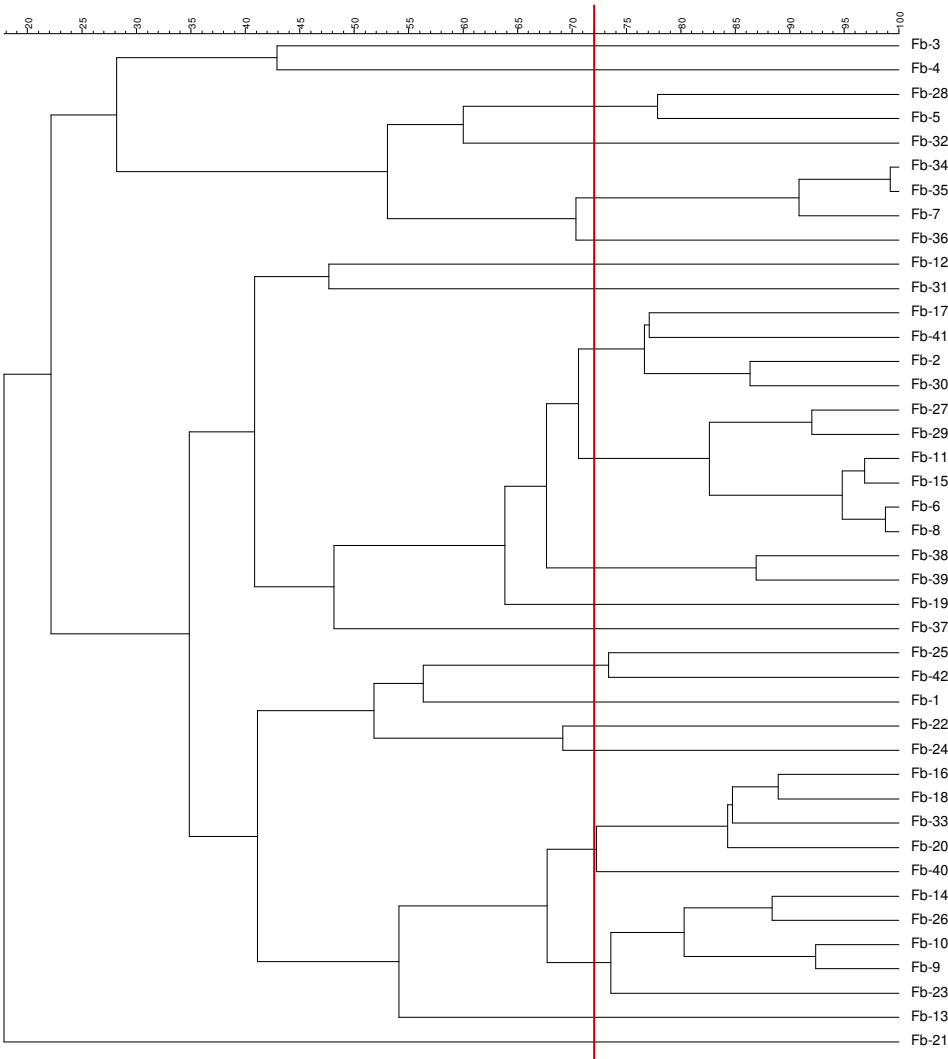


(E_a) – Rib^a da Alfarrobeira

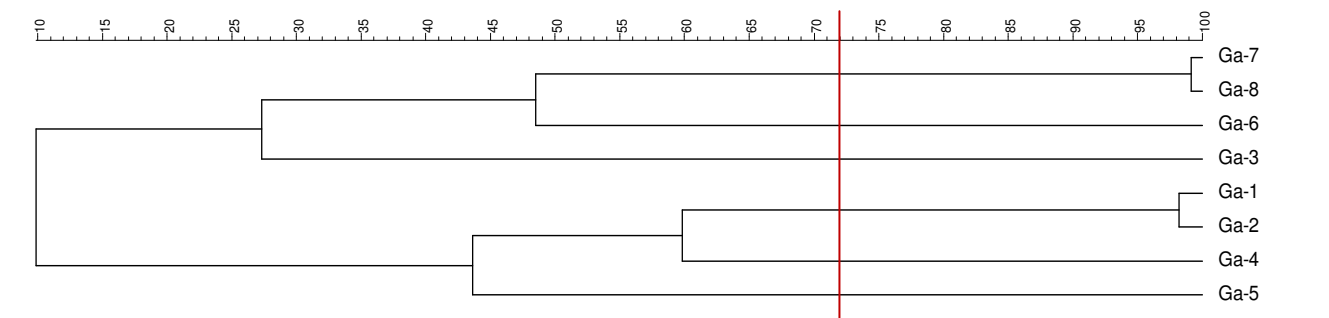


(Eb) – Rib^a da Verdelha**(Fa) – Riacho do Estaleiro**

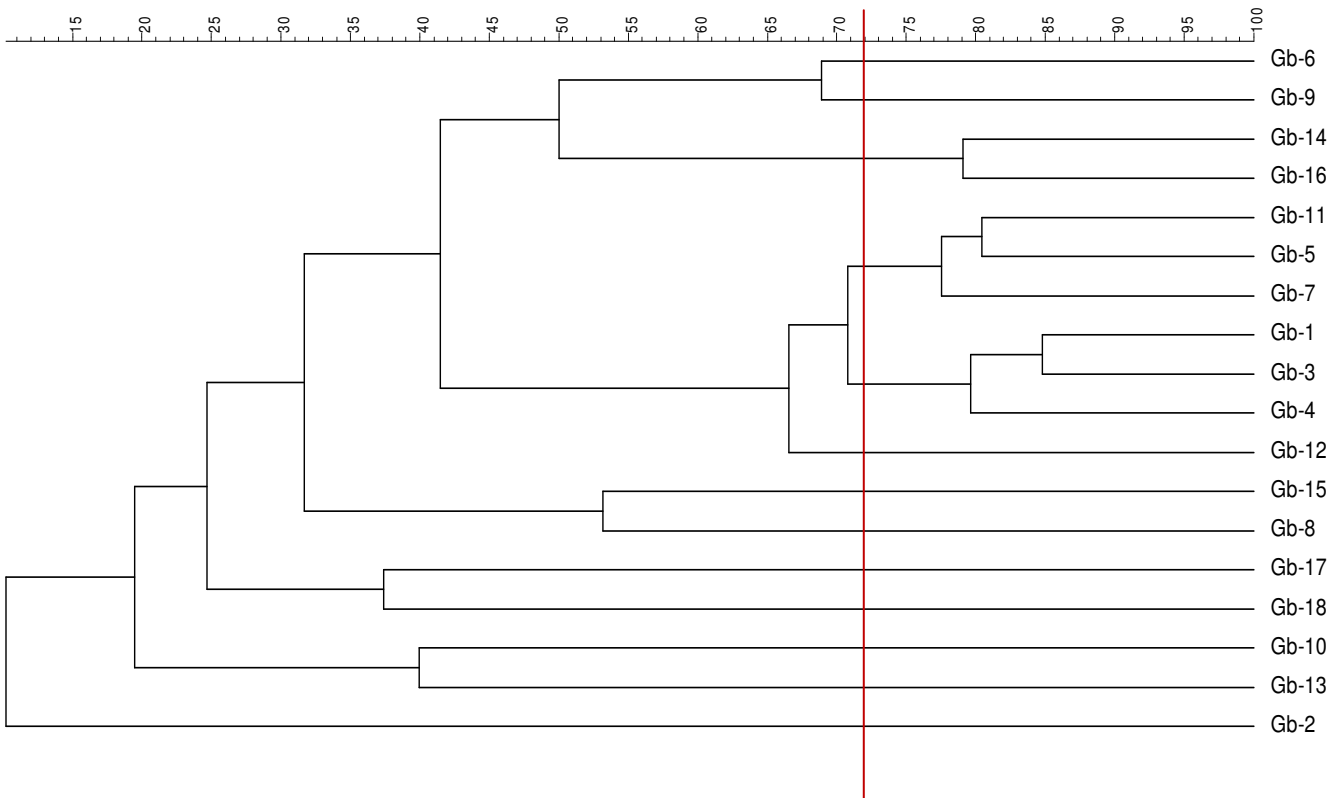
(F_b) – Riacho do Estaleiro



(G_a) – Vala mar de Cães



(G_b) – Vala mar de Cães



• *V – Tabela da diversidade de genótipos e a sua distribuição*

Estirpes	Nº de oc.	Locais de oc.	Estirpes	Nº de oc.	Locais de oc.	Estirpes	Nº de oc.	Locais de oc.	Estirpes	Nº de oc.	Locais de oc.
St1	1	1	St32	2	2	St63	5	5	St94	4	2
St2	1	1	St33	1	1	St64	1	1	St95	5	1
St3	1	1	St34	5	1	St65	1	1	St96	1	1
St4	1	1	St35	2	2	St66	1	1	St97	1	1
St5	1	1	St36	2	1	St67	1	1	St98	2	1
St6	6	1	St37	1	1	St68	1	1	St99	1	1
St7	7	3	St38	2	1	St69	1	1	St100	4	1
St8	1	1	St39	1	1	St70	1	1	St101	1	1
St9	5	4	St40	3	3	St71	1	1	St102	2	1
St10	1	1	St41	7	4	St72	1	1	St103	1	1
St11	4	1	St42	1	1	St73	3	3	St104	1	1
St12	15	6	St43	4	3	St74	1	1	St105	2	1
St13	2	2	St44	3	2	St75	1	1	St106	1	1
St14	3	3	St45	1	1	St76	2	1	St107	2	1
St15	2	2	St46	6	5	St77	1	1	St108	2	1
St16	1	1	St47	6	3	St78	2	2	St109	2	2
St17	1	1	St48	6	1	St79	1	1	St110	3	2
St18	8	2	St49	2	2	St80	74	8	St111	1	1
St19	1	1	St50	6	1	St81	1	1	St112	1	1
St20	1	1	St51	1	1	St82	1	1	St113	1	1
St21	1	1	St52	2	1	St83	1	1	St114	1	1
St22	2	1	St53	9	3	St84	1	1	St115	1	1
St23	3	2	St54	2	2	St85	1	1	St116	1	1
St24	2	1	St55	1	1	St86	1	1	St117	1	1
St25	3	2	St56	2	2	St87	7	2	St118	1	1
St26	1	1	St57	1	1	St88	5	5	St119	1	1
St27	1	1	St58	1	1	St89	1	1	St120	1	1
St28	1	1	St59	2	1	St90	3	3	St121	3	1
St29	1	1	St60	1	1	St91	10	3	St122	1	1
St30	1	1	St61	1	1	St92	1	1	St123	1	1
St31	2	1	St62	1	1	St93	1	1			

- ***VI – Dendrograma Final***